N° d'ordre 442

# THESE

*présentée à*

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

*pour obtenir*

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

*par*

Nicole DOUSSET

Attachée de Recherches au C.N.R.S.

# ACTION IN VITRO DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES LIPIDES SANGUINS

Soutenue le 1er Juin 1971 devant la commission d'examen.

MM. J. ASSELINEAU — Président

R. AGID, J. POLONOVSKI, L. DOUSTE-BLAZY — Examinateurs

N° d'ordre 442

# THESE

*présentée à*

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

*pour obtenir*

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

*par*

Nicole DOUSSET

Attachée de Recherches au C.N.R.S.

# ACTION IN VITRO DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES LIPIDES SANGUINS

Soutenue le 1er Juin 1971 devant la commission d'examen.

MM. J. ASSELINEAU — Président

R. AGID
J. POLONOVSKI
L. DOUSTE-BLAZY — Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543907_0013

# UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

# TABLEAU DU PERSONNEL

# SCIENCES

## DIRECTION DE L'UNIVERSITE

| | | | |
|---|---|---|---|
| M. LARENG | Président de l'Université | M. MARTIN | 2ème Vice-Président |
| M. MATHIS | 1er Vice-Président | | |

## HONORARIAT

| | | | |
|---|---|---|---|
| M. BLAIZOT | Doyen honoraire | M. DUPOUY | Membre de l'Institut, Doyen honoraire, Directeur Général honoraire du C.N.R.S. , Professeur honoraire |
| M. CAPDECOMME | Doyen honoraire, Recteur honoraire | | |
| M. DELTHEIL | Doyen honoraire, Recteur honoraire, Professeur honoraire | M. DURAND | Doyen honoraire |
| M. FOUCHE | Professeur honoraire | M. MORQUIER | Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut |
| M. GAUSSENS | Professeur honoraire, Correspondant de l'Institut | M. SECONDAT | Professeur honoraire |
| M. JACQUES | Professeur honoraire | M. TEISSIE-SOLIER | Professeur honoraire |
| M. MIGNONAC | Professeur honoraire | M. VANDEL | Professeur honoraire, Membre de l'Institut |

## PROFESSEURS

| | | | |
|---|---|---|---|
| M. ESCANDE | Mécanique des Fluides, Membre de l'Institut | M. LALAGUE | Mathématiques Générales |
| M. CASTERAS | Géologie, Correspondant de l'Institut | M. DESSENS | Physique du Globe, Correspondant de l'Institut |
| M. BEDOS | Chimie | M. BOUIGUE | Astronomie |
| M. CAPDECOMME | Minéralogie | M. COUCHET | Physique |
| M. DUPIN | Radioélectricité | M. LEJEUNE | Chimie |
| M. NOUVEL | Biologie Générale | M. LASCOMBES | Botanique |
| M. GALLAIS | Chimie, Correspondant de l'Institut | M. ASSELINEAU | Chimie Biologique |
| M. DURAND | Physique | M. MAURET | Chimie Systématique |
| M. FERT | Physique | M. AGID | Physiologie |
| M. DIEHL | Agronomie | M. MONTANT | Cryptogamie |
| M. LESBRE | Chimie Organique | M. GAUTIER | Physique |
| M. BRUNEL | Physiologie Végétale | M. CRUMEYROLLE | Mathématiques |
| M. HURON | Mathématiques Appliquées | M. GOURINARD | Géologie |
| M. MARGULIS | Pédologie | M. PULOU | Minéralogie |
| M. TRICHE | Chimie Analytique et Spectrographie | M. CAMBOU | Physique Spatiale |
| M. LEDOUX | Zoologie Appliquée | M. MIQUEL | Chimie |
| M. RIVALS | Agriculture | M. LACOSTE | Electrotechnique |
| M. PERRIER | Physique | M. THIBAULT | Mécanique Rationnelle et Appliquée |
| M. MATHIS | Chimie | M. MONTEL | Chimie Physique et Electrochimie |
| M. ORLIAC | Géochimie et Minéralogie | M. MASCART | Mathématiques |
| M. LAFOURCADE | Physique | M. MEDIONI | Psychophysiologie |
| M. ANGELIER | Zoologie | M. THIRRIOT | Hydrodynamique E N S E I H T |
| Mlle de FERRE | Botanique | M. BRENON | Géologie |
| M. FARRAN | Minéralogie et Géotechnique | M. LAFON | Calcul Différentiel et Intégral |
| M. LAUDET | Physique Théorique et Calcul Numérique | M. RAYNAUD P | Physiologie Animale |
| M. SERFATY | Biologie Animale | M. ZALTA | Chimie Biologique |
| M. NOUGARO | Hydraulique Générale et Appliquée | M. SEVELY | Electrotechnique |
| M. LAGASSE | Electrotechnique | M. POMMIEZ | Mathématiques |
| M. GARDY | Génie Chimique | M. REY | Biologie Végétale |
| M. BLANC | Physique Nucléaire | M. COULOMB | Physique |
| M. BIREBENT | Electronique Appliquée | M. TRINQUIER | Physique |
| M. VOIGT | Chimie Minérale | M. MARONI | Chimie |
| M. LEREDDE | Botanique | M. BEETSCHEN | Biologie Générale |
| M. LELUBRE | Géologie | M. GRUAT | Mécanique des Fluides (Hydraulique) |
| M. TROCHAIN | Botanique | M. DERACHE | Physiologie Animale |
| M. MASDUPUY | Chimie | | |

## PROFESSEURS ASSOCIES

| | |
|---|---|
| M. MANSOUR | M. PARKS |
| M. SAKUMA | |

## PROFESSEURS SANS CHAIRE

| | |
|---|---|
| M. HAMANT | Botanique |
| Mme BRUNEL | Physiologie Végétale |
| Mlle BERDUCOU | Physiologie Végétale |
| M. PICCA | Physique |
| M. MERIC | Mathématiques Appliquées |
| Mme LECAL | Zoologie |
| M. BUGAREL | Génie Chimique |
| M. MIROUSE | Géologie |
| M. PILOD | Physique |
| M. LARROQUE | Physique |
| M. BARRANS | Chimie |
| Mme LAFON | Mathématiques |
| Mlle LAPEYRE | Mathématiques - Informatique |
| M. DAT | Mécanique des Fluides |
| M. JEANNIN | Chimie Minérale |
| M. BERTRAND | Chimie |
| M. SATGE | Chimie Organique |
| M. DESQ | Mathématiques |
| M. MAHENC | Chimie |
| M. LATTES | Chimie |
| M. ROCARD | Electronique |
| M. DEGEILH | Physique |
| M. FALLOT | Biologie Végétale (Viticulture et Arboriculture) |
| M. POILBLANC | Chimie |
| M. TOUZE | Physiologie Végétale |
| M. FRASNAY | Mathématiques |
| M. CASSAGNAU | Zoologie |
| M. GUERIN | Mathématiques |

## MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|---|---|
| M. BLANCHARD | Mathématiques |
| M. HOFFMANN | Electronique |
| M. BITSCH | Zoologie |
| M. FONTAN | Physique Nucléaire |
| M. PESCIA | Physique |
| M. SICARD | Biologie Génétique |
| M. CAUSSINUS | Mathématiques Appliquées |
| M. de LOTH | Chimie Physique |
| M. MARTY | Physique Industrielle |
| M. BAUDRAS | Chimie Biologique |
| M. DURAND Ph. | Physique |
| M. LEFEUVRE | Electronique E.N.S.E.I.H.T. |
| M. SOUQUET | Géologie |
| M. SAPORTE | Physique |
| M. ATTEIA | Mathématiques |
| M. ENJALBERT | Chimie |
| M. IMBERT | Psychophysiologie |
| M. SCHNEIDER | Biologie Cellulaire |
| M. ANGELINO | Génie Chimique |
| M. MARTIN | Génie Electrique |
| M. THENOZ | Génie Civil |
| M. DABOSI | E.N.S.C. |
| M. CALVET | Mécanique des Fluides (E.N.S.E.I.H.T.) |
| M. PAGANI | Physique |
| M. CUPPENS | Mathématiques |
| M. PERENNOU | Informatique |
| M. REY | Génie Electrique |
| M. MATHIEU | Chimie Analytique |
| M. TRANNOY | Physique (E.N.S.E.I.H.T.) |
| M. CASTAGNETTO | Mathématiques (E.N.S.E.I.H.T.) |
| M. CASTAN | Informatique |
| M. GILOT | Génie Chimique (Institut du Génie Chimique) |
| M. LANTELME | Chimie Industrielle |
| M. CALMON | Techniques Agricoles |
| M. TRUCHASSON | Mécanique |
| Mlle BARBANCE | Mathématiques |
| M. VERDIER | Physique |
| M. GILLY | Génie Mécanique |
| M. VEDRENNE | Mesures Physiques |

## MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M. PUN

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT

| | |
|---|---|
| M. BEAUFILS | Informatique |
| M. DARROZES | Mécanique |
| M. PRADINES | Mathématiques |
| M. BARTHET | Mathématiques |

# PERSONNEL DE L'UNIVERSITE AFFECTE A L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

## PROFESSEURS

| | |
|---|---|
| M. ROQUES | Chimie Industrielle |
| M. GRATELOUP | Génie Electrique |
| M. MASO | Génie Civil |

## PROFESSEURS SANS CHAIRE

| | |
|---|---|
| M. CASSIGNOL | Génie Electrique |
| M. COLLETTE | Physique |

## MAITRES DE CONFERENCES

| | |
|---|---|
| M. FAGET | Physique |
| M. SCHUTTLER | Physique |
| M. MIRA | Génie Electrique |
| M. LETURCQ | Génie Electrique |
| M. SIRIEYS | Génie Civil |
| M. DURAND G. | Chimie |
| M. CARRARA | Physique |

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT

| | |
|---|---|
| M. BROUSSEAU | Physique |
| M. LACAZE | Mathématiques |

## ADMINISTRATION

| | |
|---|---|
| M. PRINEAU | Secrétaire Général de l'Université |

T H E S E

présentée à

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Nicole DOUSSET

Attachée de Recherches au C.N.R.S.

# ACTION IN VITRO DES RADIATIONS IONISANTES SUR LES LIPIDES SANGUINS

Soutenue le 1971, devant la Commission d'Examen :

MM. J. ASSELINEAU — Président

R. AGID
J. POLONOVSKI
L. DOUSTE-BLAZY — Examinateurs

A la mémoire de ma grand mère

A tous mes parents

En témoignage de mon affection

Les recherches faisant l'objet de cette thèse ont été effectuées dans le laboratoire de Biochimie de l'Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Médicales de Rangueil de Toulouse.

Je remercie mon Maitre, Monsieur le Professeur L. DOUSTE-BLAZY, qui m'a confié ce travail. Me faisant profiter de sa grande expérience et de ses conseils, il a dirigé mes recherches et contribué à l'élaboration de ce mémoire. Je désirerais qu'il trouve ici la preuve de mon respectueux et très fidèle attachement.

Je remercie Monsieur le Professeur J. ASSELINEAU, qui a bien voulu me parrainer au sein du C.N.R.S., de l'intérêt qu'il a manifesté pour ce travail et des conseils qu'il m'a donnés. Je suis sensible à l'honneur qu'il me fait en présidant cette Commission d'Examen et je le prie d'agréer ma respectueuse déférence.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur R. AGID, Directeur de l'Institut de Physiologie de Toulouse, qui me marqua sa confiance en présidant ma thèse de 3ème Cycle et qui m'a toujours suivie de sa bienveillante sollicitude. Je voudrais qu'il trouve ici l'assurance de mon respect reconnaissant.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur J. POLONOVSKI, Professeur de Biochimie au Centre Hospitalo Universitaire de Saint-Antoine de Paris, qui m'a fait l'honneur de faire partie du jury. L'intérêt qu'il m'a témoigné à plusieurs reprises et les conseils qu'il m'a prodigués ont été particulièrement précieux dans l'élaboration de ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements au Docteur J. LLOVERAS, Chargé de Recherches au C.N.R.S.,qui m'a aidée de ses conseils éclairés.

Ma reconnaissance va également à ceux qui m'ont aidée à des titres divers.

Monsieur le Professeur F. CAUJOLLE, a bien voulu m'accueillir dans son Centre de Recherches sur les Toxicités, où j'ai été aidée par Monsieur le Docteur Vétérinaire G. FAURE, Directeur des Animaleries, qui a toujours mis à ma disposition et dans les meilleures conditions les animaux nécessaires, et par Madame J. MANENT, qui m'a apporté son concours.

Monsieur le Professeur H. REGIS du Service de Radiologie du Centre Régional Anticancéreux m'a initiée aux techniques de l'irradiation.

Monsieur SIMON, Assistant du Service de Biophysique, dirigé par Monsieur le Professeur R. AUVERGNAT, a bien voulu effectuer les mesures de tension superficielle.

Mademoiselle BOLZAGUET a facilité les prélèvements de sang au Centre de Transfusion Sanguine.

Il m'est également agréable de remercier mes camarades de laboratoire qui m'ont accompagnée dans la progression de mes travaux.

Je tiens à remercier très vivement Monsieur G. RIBBES pour sa collaboration technique, Monsieur D. COURRECH, du Service d'Illustration Médicale et Monsieur GUIRAUD, du Centre Régional Anticancéreux, pour leur talent de dessinateurs, Madame C. BAILLADE et Mademoiselle M.F. SAINT-SERNIN pour le soin qu'elles ont apporté à la présentation de ce mémoire.

# INTRODUCTION

L'étude des effets biologiques de l'irradiation in vitro a concerné essentiellement les constituants des acides nucléiques (1) (2), les protéines (3) (4) et plus accessoirement les glucides (5) (6).

Dans le domaine des lipides, l'influence des radiations ionisantes a été envisagée uniquement sur des solutions pures d'acides gras (7) (8) (9) (10) (11) ou de glycérides (12). Les acides gras en solution sont transformés en peroxydes et sont plus radiosensibles sous forme estérifiée qu'à l'état libre (13).

Par ailleurs, les modifications métaboliques des lipides in vivo ont fait l'objet de nombreux travaux (14) (15). Ainsi on sait depuis longtemps que l'irradiation d'un animal entraine une hyperlipémie dont l'intensité dépend de la nature de l'organe irradié et de la dose administrée (16) (17). A cette hyperlipémie, se surajoutent des modifications qualitatives et quantitatives (16) (18) des acides gras. Les acides gras libres sont mobilisés après irradiation (19) (20) ou après radiographie du corps du rat (21). NOTARIO et coll.(22) rapportent des variations analogues chez les individus soumis à un traitement prolongé aux rayons X.

De plus, de nombreux auteurs ont signalé des modifications de la biosynthèse du cholestérol qui est stimulée par l'irradiation (23) (24) (25).

La biosynthèse des phospholipides est également perturbée. Alors que l'irradiation aux rayons X de diverses espèces animales s'accompagne de l'augmentation du phosphore lipidique plasmatique (26), l'exposition de rats aux rayons X entraine une élévation significative des polyglycerophosphatides mitochondiaux du foie (27) ; par la suite SCHWARZ et coll.(28) montrent qu'un rôle métabolique important est joué par les phosphatidylglycerols plutôt que par les cardiolipides. Récemment SOPIN et GAIDAI (29) notent que l'irradiation entraine la diminution des phospholipides des muscles, du foie et du cerveau.

Des travaux ont également porté sur les altérations du métabolisme lipoprotéique entrainées par l'irradiation in vivo; c'est ainsi que HEWITT et coll. (30) montrent une corrélation entre la mort de l'animal et le taux élevé des lipoprotéines après l'irradiation. GOLDWATER et ENTENMAN (31),étudiant les modifications subies par les lipoprotéines sériques après exposition de chiens à une dose léthale de rayons X, observent la diminution de la concentration des lipoprotéines de densité très élevée et l'élévation de la concentration des lipoprotéines légères ; ces changements s'observent 1 à 5 jours avant la mort de l'animal.

La multitude de ces travaux a trait aux répercussions de l'irradiation sur le métabolisme in vivo ; c'est pourquoi il nous a paru intéressant de chercher à mettre en évidence une action directe des radiations ionisantes sur le sang. Dans le but d'écarter les facteurs cellulaires, nous nous sommes adressée aux lipoprotéines plasmatiques.

Après une étude bibliographique concernant la peroxydation lipidique in vitro et une description des diverses techniques utilisées, nous indiquerons les résultats de l'irradiation aux rayons X des lipoprotéines plasmatiques portant essentiellement sur leurs fractions lécithiniques. Nous exposerons ensuite les résultats observés après incubation de sang avec des éléments radioactifs et l'étude des principaux effecteurs envisagés. Dans le dernier chapitre, nous rapporterons les expériences concernant le métabolisme in vivo et in vitro des produits de peroxydation lipidique due à l'irradiation.

# 1ère PARTIE

# E T U D E  B I B L I O G R A P H I Q U E

## I - La peroxydation lipidique in vitro

1 - Agents inducteurs de la peroxydation lipidique.

a) radiations ionisantes,

b) agents chimiques.

2 - Mécanisme biochimique de la peroxydation.

a) les peroxydes lipidiques.

- Définition,
- Formation des peroxydes lipidiques.
  - $\alpha$ - acides gras insaturés,
  - $\beta$ - acides gras saturés.
- Transformation des acides gras peroxydés.
  - $\alpha$ - Raccourcissement de la chaine,
  - $\beta$ - Maintien de la longueur de la chaine,
  - $\gamma$ - Polymérisation.

b) modifications des lipides peroxydés.

- Lipides non combinés aux protéines,
- Lipoprotéines.

3 - Détermination des peroxydes lipidiques.

a) principales méthodes.

- Dosage du malonaldéhyde.
  - $\alpha$ - Principe,
  - $\beta$ - Modifications de la technique,
  - $\gamma$ - Critique du principe de dosage.

- Détermination de l'absorption ultraviolette,
- Détermination des produits de la réaction à la diphényl-carbazide.
  - α - Principe
  - β - Critique du principe de dosage.
- Détermination de la consommation d'oxygène,
- Polarographie.

b) Etude comparative des principales méthodes.

- Solutions d'acides gras,
- Lipides tissulaires.

4 - Facteurs biochimiques de la peroxydation lipidique.

a) Influence de l'état du substrat.

- Effet de la concentration en tissu,
- Effet de la concentration en lipide,
- Effet de l'état du lipide,
- Effet de la richesse en acides gras insaturés,
- Effet de l'agent émulsifiant.

b) Influence du pH.

c) Influence des effecteurs.

- Acide ascorbique,
- Hémoglobine,
- Ions,
- Composition de l'atmosphère,
- Adenosine diphosphate,
- Protéines.

II - Etude métabolique des lipides peroxydés.

1 - Devenir des produits de la peroxydation lipidique.

a) hydroperoxydes,

b) malonaldéhyde,

c) acide azélaïque.

2 - Action biochimique des peroxydes lipidiques.

# E T U D E  B I B L I O G R A P H I Q U E

## I - LA PEROXYDATION LIPIDIQUE IN VITRO

### 1 - AGENTS INDUCTEURS DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE

BIERI et ANDERSON en 1960 (32) ont montré que les tissus isolés contiennent toujours quelques peroxydes lipidiques mais ceux-ci peuvent être induits par un certain nombre d'agents physiques. Outre l'oxydation thermique que nous ne retiendrons pas, nous distinguerons, parmi les plus importants, les radiations ionisantes, rayons X et rayons ultra-violets. Il faut également mentionner des facteurs chimiques de la peroxydation lipidique, tels l'ozone, l'oxygène, l'eau oxygénée et l'éthanol, et des agents biochimiques tels les lipoxydases.

a) Radiations ionisantes.

Les premiers travaux concernant les effets de l'irradiation des lipides ont porté sur les graisses alimentaires. Par la suite les auteurs se sont intéressés aux effets de l'irradiation d'abord des acides gras, ensuite des lipides tissulaires.

En 1952 MEAD (8) expose aux rayons X des solutions d'acide linoléique en tampon borate et observe que la formation de peroxydes est proportionnelle à la dose délivrée et inversement proportionnelle au débit.

Plus tard, en 1959, CLUBB et WILLS (9) montrent que des solutions diluées d'acide linoléique irradiées aux rayons X forment des peroxydes, surtout lorsque les doses utilisées dépassent 10 000 roentgens. CHIPAULT et MIZUNO (33) en 1966 obtiennent les mêmes résultats avec des esters méthyliques irradiés. WILLS et ROTBLAT (34), étudiant les effets de l'irradiation des lipides tissulaires chez le rat, signalent la production de peroxydes variable avec le tissu utilisé.

WILLS et WILKINSON (35), deux ans plus tard, rapportent la formation de peroxydes lipidiques dans les lysosomes de foie de rat. En 1967, ces mêmes auteurs (36) montrent que les différentes fractions subcellulaires du foie de rat contiennent, après irradiation in vitro, des peroxydes lipidiques ; cette formation est prépondérante dans les microsomes et minime dans les noyaux. WILLS (37) en 1970, irradiant des suspensions de microsomes de foie de rat, observe, durant la peroxydation, la dégradation des lipides et la libération de malonaldéhyde dans le milieu. Par ailleurs il montre qu'après irradiation le taux de peroxydes augmente avec le temps.

De plus, l'irradiation des globules rouges est étudiée tout d'abord par MYERS et BIDE en 1966 (38) chez le rat, ensuite par SUTHERLAND et PIHL en 1968 (39) chez l'homme. Ces auteurs montrent que le taux de peroxydes s'accroit pour des doses supérieures à 50 000 roentgens.

L'irradiation ultraviolette d'émulsions d'acide linoléique et linolénique est suivie, selon BAKER et WILSON (40), de la formation de malonaldéhyde, produit de décomposition des peroxydes lipidiques. UGAZIO et GABRIEL (41) observent également la formation de peroxydes lipidiques par irradiation ultraviolette d'émulsions aqueuses d'acide linoléique.

Des facteurs autres que les radiations ionisantes peuvent induire la formation de peroxydes lipidiques.

b) Agents chimiques.

L'eau oxygénée s'est avérée être un facteur déterminant de la formation de peroxydes lipidiques. DODGE et coll. (42),en 1967,montrent que l'incubation de globules rouges de malades présentant une abétalipoprotéinémie,avec de faibles quantités de peroxyde d'hydrogène,s'accompagne de la formation de peroxydes lipidiques. JACOB et LUX (43) signalent aussi l attaque des membranes globulaires de rat par l'eau oxygénée, en relation avec les phénomènes de peroxydation des acides gras insaturés, provenant pour la majeure partie des phosphatidyléthanolamines.CLARK et coll. (44) mettent en évidence la formation d'acides gras peroxydés dans les lipoprotéines sériques humaines incubées en présence d'eau oxygénée.

L'effet toxique de fortes pressions d'oxygène est reconnu depuis de nombreuses années. Mais ce n'est qu'en 1960 que ZALKIN et TAPPEL (45) signalent que des homogénats de tissus animaux forment des peroxydes lipidiques après leur incubation in vitro en condition aérobie.

HOCHSTEIN et ERNSTER (46) montrent que les microsomes de foie produisent du malonaldéhyde pendant l'oxydation enzymatique du TPNH et en tirent la conclusion que ce produit vient de la dégradation peroxydative des lipides microsomaux. KANN et coll. en 1964 (47) soulignent que des globules rouges de souris en avitaminose E et incubés avec de l'eau oxygénée se peroxydent, ce phénomène étant accru dans les globules rouges de souris exposées à de fortes pressions d'oxygène. L'incubation de microsomes de foie de rat en présence de TPNH et d'ATP sous des pressions hyperbares d'oxygène (48) s'accompagne de l'apparition de phospholipides plus polaires que les phosphatidyléthanolamines, conséquence de la peroxydation de la chaîne insaturée d'acides gras du phospholipide. Récemment TAM et Mc CAY (49) démontrent que,durant l'oxydation du TPNH, les phospholipides insaturés membranaires subissent un clivage oxydatif des acides gras polyinsaturés situés en position $\beta$.

L'exposition de globules rouges humains à l'ozone entraîne, selon les travaux de GOLDSTEIN et BALCHUM (50), la formation de peroxydes lipidiques, responsables de la toxicité de l'ozone.

DI LUZIO et HARTMAN (51) étudient l'influence de l'addition d'éthanol sur la peroxydation lipidique d'homogénats de foie de rat. L'addition d'éthanol au milieu augmente de manière significative la peroxydation lipidique.

DODGE et PHILLIPS (52) en 1966 révèlent qu'après chromatographie sur colonne d'acide silicique d'extraits lipidiques globulaires, les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylsérines sont diminuées ; de plus il y a diminution des acides linoléique et arachidonique dans l'échantillon altéré et augmentation des produits d'oxydation.

c) Agents biochimiques

Des enzymes peuvent catalyser l'oxydation des acides gras insaturés par l'oxygène moléculaire, ce sont les lipoxydases. La réaction,qui semble être spécifique des acides gras possédant un groupement méthylène, consiste en la formation d'hydroperoxy-acides insaturés (53).

La présence de lipoxydases chez les végétaux est très générale, la source la plus abondante en est la graine de soja. C'est ainsi que DOLEV et coll. (54) observent après incubation d'acide linoléique avec la lipoxydase la formation exclusive d'acide 13-hydroperoxyoctadeca-9,11-diénoïque. HAMBERG et SAMUELSSON (55) (56) montrent que l'oxydation d'un grand nombre d'acides insaturés par la lipoxydase du soja est très spécifique ; la molécule d'oxygène est introduite sur le carbone en position $\omega_6$. Mais selon GARDNER (57), l'oxydation de l'acide linoléique catalysé par la lipoxydase du blé, à moins que celle-ci ne soit partiellement purifiée, donne comme produit final d'oxydation non l'hydroperoxyde mais d'autres composés dus à l'intervention d'isomérases. Pour GRAVELAND (58), l'incubation d'acide linoléique avec la farine aboutit,par action de la lipoxydase,à la formation de deux hydroperoxydes isomères.

L'activité lipoxydasique peut être modifiée par l'action des radiations ionisantes. C'est ainsi que KUZIN et MERKULOV (59) signalent la stimulation de l'activité lipoxydasique de graines de maïs soumises à des doses de 1000 et 5000 roentgens de rayons $\gamma$ de $^{60}Co$, alors que des doses plus élevées (10 000 et 40 000 roentgens) entrainent une inhibition de l'enzyme.

Chez l'animal, les lipoxydases sont rarement signalées ; HAMBERG et SAMUELSSON (60) ne détectent aucun hydroperoxyacide après incubation d'acides gras insaturés avec des préparations enzymatiques de vésicules séminales de mouton.

## 2 - MECANISME BIOCHIMIQUE DE LA PEROXYDATION.

### a) Les peroxydes lipidiques.

#### - Définition

Dans le langage chimique, le terme de peroxydes désigne un ensemble de composés qui ont,tous, deux atomes d'oxygène liés l'un à l'autre.

Dans le domaine des corps gras, on entend par peroxydes les corps qui prennent naissance par auto-oxydation, c'est-à-dire par fixation spontanée d'oxygène à partir des composés éthyléniques, en présence ou non d'effecteurs.

Cette réaction,étant autocatalytique, commence très lentement, puis,après une période d'induction où l'oxydation est pratiquement indécelable, s'accélère de façon exponentielle.

#### - Formation des peroxydes lipidiques.

##### $\alpha$ - Acides gras insaturés.

Le mécanisme d'autoxydation des acides insaturés a d'abord été évoqué par FARMER et SUTTON (61), ensuite réexaminé par HOLMAN (62).

FARMER et SUTTON (61) démontrent que l'autoxydation d'acides insaturés tels que les acides oléique, linoléique et linolénique est nécessairement déclenchée par un radical libre qui provient de la rupture d'une liaison covalente.

En dessous de 60°, la réaction prédominante est la formation d'un hydroperoxyde en α de la double liaison, Les radicaux oxydants, tels qu OH˙ sont les principaux agents de l'initiation de l'oxydation. Ils agissent en enlevant un atome d'hydrogène à la chaîne d'acide gras. C'est ainsi que pour un composé éthylénique nous pouvons écrire :

$$R_1CH = CH - CH_2 - CH = CHR_2 \quad + \quad OH^{\cdot}$$

$$\longrightarrow \quad R_1CH = CH - \dot{C}H - CH = CHR_2 \quad + H_2O$$

$$R_1CH = CH - CH = CH - \dot{C}HR_2 \text{ ou } \quad R_1\dot{C}H = CH - CH = CH - CHR_2$$

Ce type de composé, renfermant un système diénique conjugué, est responsable de l'absorption ultraviolette à 233 mμ de ces corps.

Les radicaux libres formés peuvent ensuite réagir avec l'oxygène et donner :

$$R_1CH = CH - CH = CH - \dot{C}HR_2 \quad + \quad O_2$$

$$\longrightarrow \quad R_1CH = CH - CH = CH - \underset{\displaystyle O}{\underset{|}{\overset{|}{CHR_2}}}$$

$$\underline{\text{lipoperoxyde}} \qquad \overset{O}{\cdot}$$

Le lipoperoxyde formé réagit avec une autre molécule d'acide gras insaturé qui, par perte d'hydrogène, donne l'hydroperoxyde correspondant. Une réaction en chaîne est ainsi déclenchée.

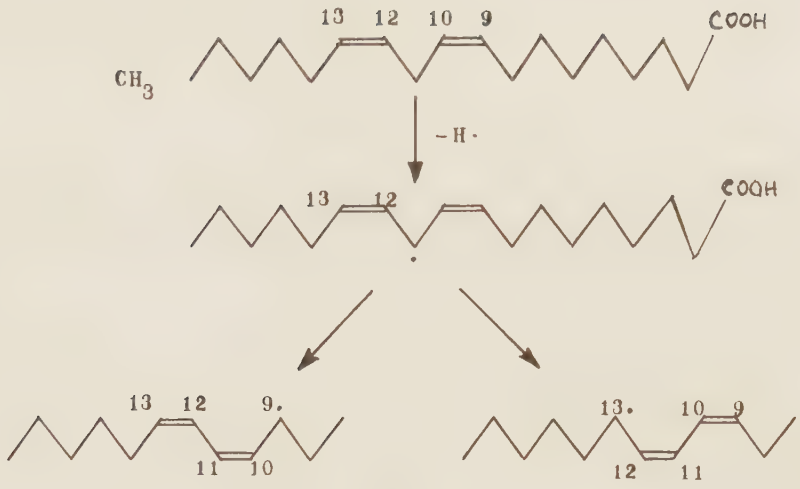
$$R_1CH = CH - CH = CH - \underset{\displaystyle O}{\underset{|}{\overset{|}{CHR_2}}} \quad + \quad R_3CH_2 - CH = CHR_4 \longrightarrow$$

$$R_1\dot{C}H = CH - CH = CH - \underset{\displaystyle O-O-H}{\underset{|}{CHR_2}} \quad + \quad R_3\dot{C}H - CH = CHR_4$$

Hydroperoxyde

La formation de peroxydes est augmentée en milieu acide (34).

Il faut remarquer que l'autoxydation de l'acide linoléique par exemple donne naissance à deux radicaux peroxydes isomères (63).




De la même façon, l'acide linolénique donne quatre isomères peroxydes et l'acide arachidonique six.

L'oxydation par les rayons $\gamma$ du $^{60}Co$ de l'oléate de méthyle est accompagnée de la formation d'hydroperoxydes; celle-ci est augmentée par les agents émulsifiants (64).

Au-dessus de 60°, le mode de formation du peroxyde est différent; l'oxygène se fixe sur la double liaison pour donner un epoxyperoxyde.

$$R - CH_2 - CH = CH - R' \longrightarrow R - CH_2 - \underset{\underset{O}{|}}{CH} - \underset{\underset{O}{|}}{CH} - R'$$

PAQUOT et coll. ( 65) montrent par autoxydation (catalysée par des sels de vanadium) de l'oléate de méthyle à 50° l'isomérisation de l'hydroperoxyde $- CH = CH - \underset{\underset{O-OH}{|}}{CH} -$

en époxy-alcool $- \underset{\diagdown O \diagup}{CH} - \underset{\underset{OH}{|}}{CH} -$

β - Acides gras saturés.

La question de l'autoxydation des acides gras saturés, quoique moins étudiée que celle des acides gras insaturés, a été cependant envisagée.

RAMANATHAN et coll. (66), analysant l'oxydation thermique des laurate et stéarate de méthyle, suggèrent une déshydrogénation de la molécule,comme première étape de l'oxydation, suivie de la formation d'hydroperoxydes. Pour BRODNITZ et coll. (67), il semble que l'attaque oxydative des esters d'acides gras saturés à 150° ne consiste pas initialement en l'insaturation de la molécule. L'autoxydation se produit de préférence vers le centre de la chaîne. La formation d'un radical libre est apparemment l'étape initiale de l'autoxydation des acides saturés et les premiers produits stables sont les monohydroperoxydes (68). THALER et KLEINAU (69) (70) montrent qu'aucune substance insaturée n'est formée par

oxydation des acides stéarique et laurique. Les premiers produits de la dégradation (par β oxydation préférentielle) de ces acides et de leurs esters seraient des alcanes 2-ones et des aldéhydes à un atome de carbone de moins que l'acide gras.

- Transformation des acides gras peroxydés.

Cette destruction des peroxydes lipidiques a lieu soit à des températures supérieures à 130°, soit à plus basse température ; elle accompagne toujours la formation des peroxydes dès que la peroxydation devient notable. Cette destruction donne alors naissance à des composés secondaires d'oxydation.

α - Raccourcissement de la chaine.

Tout d'abord les peroxydes lipidiques peuvent se cliver et donner toute une série de composés à chaîne courte, dont les plus importants sont les aldéhydes et les cétones. SHEPPARD et BURTON (7) et BURTON (71) démontrent qu'une des réactions majeures des acides gras saturés sous l'effet des rayons α est la décarboxylation produisant des hydrocarbures à 1 atome de carbone de moins que l'acide gras initial. Dans les produits de l'oxydation thermique des laurate et stéarate de méthyle, RAMANATHAN (66) met en évidence la présence d acide nonanoïque, produit secondaire de l'oxydation de ces acides. L'irradiation d'esters méthyliques entraîne l'apparition de composés carbonylés (33) (72). L'irradiation des stéarate et oléate de méthyle s'accompagne de la formation d'alcanes jusqu'à 13 atomes de carbone, d'alcènes et d'alcynes ; ces produits proviennent d'un clivage direct de la liaison (73). L'irradiation d'acide palmitique est suivie de l'apparition d'acides à nombre d'atomes de carbone pair et impair inférieur à celui de l'acide palmitique (10). HORVAT et coll. en 1965 (74), analysant les produits de l autoxydation du linoléate de méthyle, signalent la présence d'aldéhydes dont les deux plus importants sont l'hexanal et le pentanal. Ceux-ci par la suite se condensent et donnent des composés volatiles trialkyl-trioxanes (75). Une étude détaillée de l'autoxydation des esters d'acides polyinsaturés a été faite par SCHAUENSTEIN (76). Les hydroperoxydes, premiers produits de l'oxydation, étant des composés instables, réagissent avec l'oxygène pour donner des aldéhydes et des cétones. Ces composés peuvent être hydrolysés pour donner d'autres produits tels que des acides carboxyliques ou des semi esters d'acides carboxyliques (77). GUILLET et GILMER (78) signalent la décomposition des peroxydes des acides laurique, décanoïque et octanoïque. De même l'autoxydation d'acides gras tels que les acides laurique, myristique et stéarique et de leurs esters méthyliques s'accompagne de l'apparition de produits de clivage et parmi eux un grand nombre de méthylcétones, aldéhydes et acides carboxyliques (70).

β - Maintien de la longueur de la chaine.

Les acides gras peuvent également se transformer en produits d'oxydation, de même longueur de chaîne que l'acide de départ. C'est ainsi que HAMBERG et SAMUELSSON (60) rapportent que l'incubation d'acide $^{14}$C-linoléique avec le surnageant d'un homogénat de glande vésiculaire de mouton est suivie de la formation d'acides hydroxydiénoïques, dont certains

sont les précurseurs des prostaglandines. De même la réduction enzymatique des hydroperoxydes de l'acide linolénique s'accompagne de la production d'acides hydroxylés (79).

### γ - Polymérisation

Des produits d'oxydation de poids moléculaire supérieur à ceux des acides de départ peuvent exister. Ils résultent de la polymérisation de deux ou plusieurs chaînes oxydées, liées entre elles soit par des ponts oxygène, soit par des liaisons carbone-carbone.

SCHAUENSTEIN (76) signale que l'autoxydation des acides gras polyinsaturés est suivie de l'apparition de dimères et même de polymères. HOWTON et WU (80) mettent en évidence dans les produits de la radiolyse par les rayons γ de l'acide oléique la présence de polymères. Cette polymérisation est à rapprocher de la formation de dimères par oxydation thermique (81). Ces dimères seraient formés de la jonction d'une molécule d'ester d'acide gras et d'une molécule d'hydroperoxyde (82).

Sur la figure 1, sont signalés les produits de l'autoxydation de l'acide oléique.

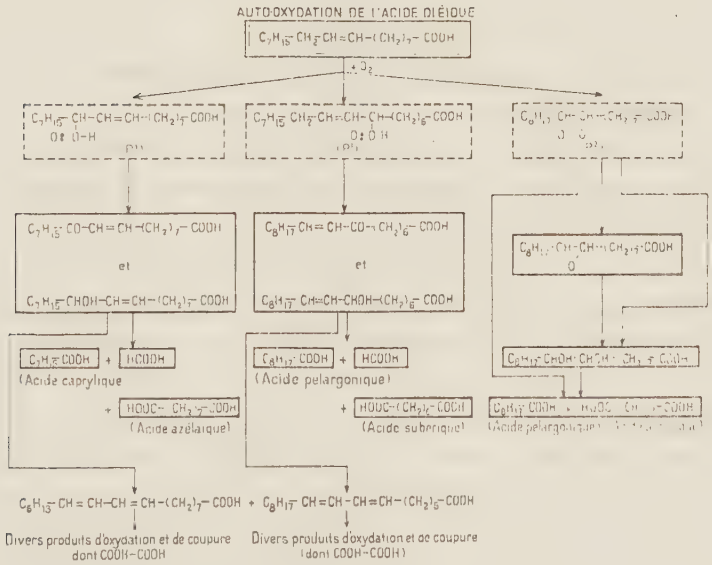



FIGURE 1 - Produits de l'auto-oxydation de l'acide oléique (83).

b) Modifications des lipides peroxydés.

- Lipides non combinés aux protéines.

A notre connaissance, l'étude de la peroxydation des lipides non combinés aux protéines n'a porté que sur les triglycérides.

En 1958, WITTING et SCHWEIGERT (84) rapportent les résultats de l'irradiation par les rayons $\gamma$ de graisses alimentaires. Ils signalent, dans le lard irradié, la présence de composés carbonylés volatiles, tels que les aldéhydes de 3 à 10 atomes de carbone, l'acroléine, les aldéhydes crotonique et 2, 4-undécadiénoïque constituant la majorité (48,1%). Pour LUCK et KOHN (10) l'exposition de graisses telles que la tripalmitine aux rayons cathodiques s'accompagne de la formation d'acides gras saturés et insaturés à courte longueur de chaîne. L'étude sur la radiolyse des triglycérides a été par la suite reprise par DUBRAVCIC et NAWAR (12). Ces auteurs étudient les effets de l'irradiation par les rayons $\gamma$ de $^{60}Co$ des triglycérides saturés et insaturés. Les produits de la radiolyse des triglycérides saturés sont constitués essentiellement d'hydrocarbures et de quelques composés oxygénés. Parmi les hydrocarbures, ils signalent des alcanes et des alcènes. Le principal alcane a un atome de carbone de moins et l'alcène deux atomes de carbone de moins que l'acides gras initial.

Les triglycérides insaturés, la trioléine par exemple, donnent, par irradiation, des alcanes de un à neuf atomes de carbone, des alcènes de 2 à 17 atomes de carbone, et des alcadiènes de onze à dix sept atomes de carbone également. En plus de ces hydrocarbures, deux aldéhydes sont aussi formés à partir de ces triglycérides insaturés irradiés, l'un à même nombre d'atomes de carbone et même nombre de doubles liaisons que dans l'acide gras du triglycéride initial et l'autre avec une double liaison supplémentaire.

Ces mêmes auteurs signalent la possibilité de combinaison de radicaux libres pouvant entraîner la formation de composés dimères ou polymères. L'irradiation des triglycérides, d'après ces résultats, est donc suivie de l'apparition des trois types de composés signalés par dégradation des hydroperoxydes lipidiques à savoir : composés à chaîne courte, produits d'oxydation à même longueur de chaîne que l'acide initial et produits de polymérisation de deux ou plusieurs chaînes oxydées. Par la suite ces mêmes auteurs (85) obtiennent des résultats comparables par irradiation de lipides de poissons.

Des dérivés identiques sont produits par irradiation de graisses de boeuf (86). Ces composés sont comparables à ceux qui sont obtenus à partir de graisses traitées par la chaleur (87).

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par SHEPPARD et BURTON (7), puis par HOWTON et WU (80) sur l'étude des produits de l'irradiation des acides gras libres.

- Lipoprotéines.

La plupart des lipides étant combinés sous forme de lipoprotéines, les modifications entraînées par les peroxydes lipidiques peuvent intéresser également la combinaison lipides-protéines.

C'est ainsi que DESAI et TAPPEL (88) d'une part, NARAYAN et KUMMEROW (89) d'autre part montrent la formation de complexes entre les protéines et les lipides oxydés et la dénaturation des protéines par ces lipides.

Selon ces derniers auteurs, les complexes protéines-lipides oxydés devraient être responsables d'une part de la formation de pigments bruns, observés par FILLER et coll. (90) dans l'utérus de rat en avitaminose E, d'autre part de l'accumulation de pigments céroïdes dans le foie de rats déficients en choline (91). L'existence de ce complexe qui s'établit à 30°C à un pH optimum de 7,0 suggère la participation in vivo de ces complexes dans la dégénérescence d'organes ou de tissus (89) (92). CLARK et coll. (44) postulent que le développement de l'athérosclérose est dû à l'oxydation des lipoprotéines avec perte de l'affinité lipides-protéines et à l'accumulation des produits peroxydés dans le système vasculaire. ROUBAL et TAPPEL (93) signalent également l'interaction des protéines avec les peroxydes lipidiques et la polymérisation de la protéine et du lipide peroxydé. Cette polymérisation peut survenir de deux manières, l'une avec incorporation du radical lipidique dans les polymères, et l'autre avec participation exclusive de la molécule protéique.

Outre la formation de complexes entre les protéines et les lipides oxydés, les lipides altérés par la peroxydation se révèlent être plus polaires que les lipides normaux. Cette modification de la polarité des lipides peut intéresser soit les lipides neutres, soit les phospholipides. L'addition d'eau oxygénée aux lipoprotéines plasmatiques humaines entraîne la formation d'une forme plus polaire d'esters de cholestérol (44) intéressant exclusivement les $\alpha$-lipoprotéines. L'augmentation des fractions les plus polaires dans les phospholipides, induite par divers agents oxydants, est signalée, par de nombreux auteurs (48) (52) (94) (43). Une étude plus détaillée des altérations des phospholipides est effectuée par MAY et Mc CAY (95) au cours de l'oxydation du TPNH par les microsomes hépatiques de rat. Ces auteurs mettent en évidence la diminution des phosphatidyléthanolamines des microsomes et parallèlement l'augmentation de phospholipides plus polaires. Le taux de liaisons esters restant voisin de la normale, les auteurs rejettent l'éventualité d'une hydrolyse. La perte des acides arachidonique et docosahexaenoïque s'effectue au même degré dans les fractions phosphatidyléthanolamines et phosphatidylcholines des microsomes.

## 3 - DETERMINATION DES PEROXYDES LIPIDIQUES.

L'intensité de la peroxydation lipidique doit être étudiée, aussi bien dans les expériences portant sur les solutions d'acides gras que dans les expériences portant sur les lipides tissulaires.

### a) Principales méthodes.

les méthodes existantes sont nombreuses. La plupart mesurent par voie chimique ou par voie physique les produits formés au cours de la peroxydation.

- Dosage du malonaldéhyde.

α - Principe.

En 1944 KOHN et LIVERSEDGE (96) décrivent la réaction colorée avec l'acide 2-thiobarbiturique (ATB) d'une substance inconnue formée durant l'incubation aérobie d'homogénats tissulaires. Cette substance est plus tard identifiée par BERNHEIM et coll. (97) à un produit de l'oxydation des lipides comportant 3 atomes de carbone. PATTON et KURTZ (98) en 1951 l'identifient à l'aldéhyde malonique (AM), produit secondaire de la peroxydation lipidique. DAHLE et coll. (63) décrivent le mécanisme de la réaction par laquelle AM dérive des acides gras insaturés. Le mécanisme proposé fait intervenir un peroxyde cyclique, intermédiaire de la formation de AM. La réaction de 1 mole de AM avec 2 moles de ATB en milieu acide avec chauffage forme un dérivé coloré triméthénique (99) (100). Le principal composé est considéré être le malonaldéhyde (98).

La technique de dosage de AM par ATB, décrite par WILBUR et coll. (101) en 1949, utilise la réaction de l'échantillon à analyser avec l'acide trichloracétique à 20% et l'acide 2-thiobarbiturique. Elle a été modifiée par la suite par PLACER et coll. (102). Les homogénats tissulaires, en solution dans du tampon, sont incubés à 37° pendant 30' puis additionnés du réactif à l'acide thiobarbiturique. Le mélange est chauffé à 100° pendant 10' puis refroidi ; après extraction par un mélange pyridine-n butanol (3 : 1,v/v) et addition de soude N, la lecture est faite à 548 mμ.

SINNHUBER et coll. (103) examinant le pigment résultant de la réaction de ATB avec le malonaldéhyde ou avec l'huile de saumon oxydée, les trouvent identiques. Deux pour cent seulement de AM de l'huile de saumon sont libres, le reste est libéré par chauffage en milieu acide (103).

β - Modifications de la technique.

La technique d'origine de dosage de AM peut être modifiée. Tout d'abord la préparation tissulaire peut être précipitée par l'acide trichloracétique et le surnageant incubé avec ATB à 100° (32) (104).

L'ensemble (précipité et surnageant) peut être incubé avec ATB à 100° et le surnageant séparé après ébullition (105) (106).

La détermination de AM peut être effectuée après extraction lipidique. MENGEL et coll. (107) testent le résidu de l'extraction lipidique avec ATB en solution trichloracétique. WILLS et ROTBLAT (34) disolvent les lipides tissulaires dans de l'acide acétique glacial avant de déterminer AM. Selon STOCKS et DORMANDY (108), l'incubation du précipité par l'acide trichloracétique avec ATB à 100° donne une réaction positive dans les globules rouges humains sans qu'il y ait d'agent inducteur de la peroxydation. Elle serait due au complexe de l'acide thiobarbiturique avec l'acide formylpyruvique.

γ - Critique du principe de dosage.

La réaction à l'acide thiobarbiturique est devenue un essai empirique d'au-

toxydation lipidique. Le test d'indice de peroxydation par l'acide thiobarbiturique a été appliqué à différents tissus (109). Certains en font un indice de la peroxydation phospholipidique (110).

Elle est très utilisée pour la détermination des peroxydes lipidiques des tissus (111) (32). Le principal composé réactif à ATB est une substance soluble dans l'eau formée ou libérée par chauffage de l'échantillon en milieu acide. La méthode offre une grande sensibilité dans la détection et dans la mesure de l'autoxydation lipidique (63). La méthode est sensible à $10^{-8}$ mole de malonaldéhyde pour 100 ml de solution (112); cependant la coloration à ATB développée à partir de lipides oxydés d'échantillons tissulaires varie avec la composition en acides insaturés. Ainsi dans des conditions identiques d'autoxydation, l'intensité de la coloration est proportionnelle au degré d'insaturation des acides gras.

De plus la méthode à l'acide thiobarbiturique ne mesure pas la peroxydation lipidique directement, mais mesure la concentration du malonaldéhyde ou d'autres aldéhydes libérés à partir d'acides gras insaturés oxydés (113). Avec un matériel biologique en effet, la réaction à ATB ne peut pas être utilisée comme une mesure directe des peroxydes ; elle a seulement une valeur empirique pour apprécier la présence de produits d'oxydation(63).

Il faut considérer les possibilités d'interférence par production de chromogène, de substances non lipidiques (101). Le saccharose, le desoxyribose, les acides désoxyribonucléiques et la 2-aminopyrimidine produisent du malonaldéhyde par oxydation périodique (35). Il en est de même d'aldéhydes sériques (114). YAMAZAKI (115), KITABCHI et WILLIAMS (116) signalent que le maximum d'absorption utilisé pour la mesure des peroxydes lipidiques par le ATB est identique à celui d'un témoin d'AM.

Cependant, NISHIGAKI et coll. (117) analysent les peroxydes lipidiques sériques après extraction lipidique et notent également pour le pigment un spectre identique à celui du complexe AM-ATB.

La possibilité qu'un aldéhyde chromogène soit libéré des protéines par irradiation est peu probable, et les aldéhydes autres que le malonaldéhyde, c'est à dire le crotonaldéhyde, le formaldéhyde et l'acétaldéhyde ne donnent pas la coloration rose caractéristique (118). Selon OKUMA et coll. (119), les chromophores autres que celui dû à la combinaison de AM avec ATB ont un maximum d'absorption différent de celui de AM avec ATB.

De plus il faut signaler que la mesure de l'oxydation lipidique mesurée par la concentration du malonaldéhyde dans l'organisme peut varier du fait d'un métabolisme très intense de AM (120). Le malonaldéhyde est métabolisé dans les homogénats en présence d'ATP (121). Donc le test du malonaldéhyde ne peut être utilisé comme un test de peroxydation lipidique in vivo, car le AM est métabolisé dans le foie (122).

- Détermination de l'absorption ultraviolette.

Les produits d'autoxydation des lipides peuvent être déterminés par mesure de l'absorption à 234 et 268 mμ. L'absorption à 234 mμ résulte de la formation d'un système de liaisons conjuguées formées dans le processus d'oxydation (62).

Durant l'exposition brève à l'oxygène à 37° LEA (123) observe, à partir de phosphatidyléthanolamines d'oeufs, une absorption développée dans l'ultraviolet, particulièrement dans la région de 235 mμ, habituellement associée, dans les graisses oxydées, aux dièmes conjugués et une absorption moindre dans la région 270-280 mμ correspondant aux dièmes cétoniques. Dans les lipides autoxydés globulaires, DODGE et PHILLIPS (52) notent l'absorption à 234 et à 268 mμ en relation avec l'apparition de dièmes et de triènes conjugués.

Cette technique de mesure de la peroxydation lipidique n'est pas adaptée, selon WILLS et ROTBLAT (34) à la détermination des peroxydes tissulaires. Ces auteurs lui préférent la technique à l'acide thiobarbiturique. Cependant REKNAGEL et GHOSHAL (121) ont observé la présence de dièmes conjugués dans les lipides microsomiques hépatiques après intoxication par la tétrachlorure de carbone.

- Détermination des produits de la réaction à la diphényl-carbazide (méthode de STAMM).

α - Principe

Cette méthode est basée sur la réaction colorée que les hydroperoxydes donnent avec la 1, 5-diphényl-carbazide (124) (125).

La diphenyl-carbazide est oxydée par les peroxydes en diphénylcarbazone et ce composé a un spectre maximum à 565 mμ. La sensibilité de la réaction est fortement augmentée par l'acide acétique (126) ; en effet l'absorption de la diphényl-carbazone dans le tétrachloroéthane s'élève avec la concentration en acide acétique, le maximum étant atteint pour une concentration de 20% en acide.

β - Critique de la méthode de dosage.

HAMM et coll. (125) montrent que l'absorption du diphényl-carbazone de l'acide laurique est une fonction linéaire de la quantité de peroxyde.

Cependant la couleur produite dans le test de STAMM n'est pas stable et la lecture doit être faite dans les 30 minutes suivant le dosage. De plus les solutions de diphényl-carbazone dans le tétrachloroéthane ne sont pas stables, le diphényl- carbazone étant oxydé par l'oxygène de l'air (127).

Malgré cet inconvénient, cette technique donnerait de bons résultats dans les expériences de peroxydation in vitro des acides gras purs (125).

- Titration iodométrique.

WHEELER (128), en 1932, a mis au point une méthode iodométrique pour la détermination des peroxydes lipidiques, basée sur la propriété qu'ont les substances oxydantes de libérer de l'iode à partir d'iodure.

Cette méthode a été appliquée à l'étude de la peroxydation lipidique d'homogénats par KALISH et DI LUZIO (129). Cette méthode manque de spécificité.

- Détermination de la consommation d'oxygène

Une technique permettant l'étude de la peroxydation lipidique consiste à mesurer l'oxygène absorbé par un composé ou un tissu à l'aide d'un appareil de Warburg (83). Si on étudie la cinétique d'absorption de l'oxygène pour l'oléate de méthyle par exemple, on obtient d'abord une absorption lente d'oxygène, puis une absorption rapide, enfin un ralentissement allant jusqu'à l'arrêt.

Ainsi les taux de peroxydation peuvent être étudiés manométriquement (130).

La valeur de la consommation d'oxygène n'indique pas l'intensité de la peroxydation lipidique, mais seulement la facilité qu'ont certains lipides de se peroxyder.

- Polarographie.

Cette méthode permet de distinguer les deux formes de peroxydes : hydroperoxyde et époxyperoxyde (83).

Ainsi l'hydroperoxyde d'oléate de méthyle donne par réduction polarographique une "vague" ayant un potentiel de demi-palier de -0,9V, tandis que l'époxyperoxyde ne donne pas de vague polarographique.

De plus, la largeur de cette vague à 0,9 V est proportionnelle à l'indice de peroxyde. Cette technique permettrait donc à la fois de discriminer et de doser les deux formes de peroxydes.

b) Etude comparative des principales méthodes.

L'examen de ces méthodes de dosage de la peroxydation lipidique montre qu'elles ont des caractéristiques différentes. Il s'agit donc de déterminer la technique à utiliser dans les différentes expériences. Il faut en premier lieu considérer le substrat de la peroxydation ; s'agit-il de solutions pures d'acides gras ou bien d'homogénats tissulaires ?

- Solutions d'acides gras.

Les acides gras insaturés étant le substrat de la peroxydation lipidique, les différentes techniques d'indice de peroxydation ont été primitivement utilisées dans ce domaine.

C'est ainsi que WILBUR et coll. en 1949 (101) signalent que la réaction à l'acide thiobarbiturique (ATB) mesure les degrés de l'oxydation de l'acide linolénique et des acides gras plus insaturés. De plus ces mêmes auteurs comparent l'oxydation des acides linolénique et arachidonique ; ils trouvent, pour des consommations d'oxygène identiques, une intensité de réaction de l'acide linolénique supérieure à celle de l'acide arachidonique. KENASTON et coll. (131) en 1955 montrent que le test ATB pour les produits d'oxydation des acides linoléique et linolénique est le plus sensible de toutes les méthodes chimiques utilisées, mais ne permet pas de doser avec précision les produits d'oxydation de l'acide oléique. DAHLE et coll (63) comparent le test à ATB au

spectre ultraviolet et à la consommation d'oxygène appliqués aux acides gras polyinsaturés. Le test à ATB est proportionnel au nombre de doubles liaisons pour les esters méthyliques des triènes, tetraènes, pentaènes et hexaènes. De même il existe une proportionalité entre le test à ATB et la consommation d'oxygène. Ceci confirme les résultats de KENASTON et coll. (132) qui signalent, durant l'autoxydation du linolénate, un parallélisme entre la réaction à ATB et la valeur des peroxydes lipidiques. Les valeurs de la peroxydation obtenues par méthode iodométrique et par réaction à ATB sont comparables.

La relation linéaire entre la réaction à ATB et la mesure des dienes conjugués pendant l'oxydation de chaque ester d'acide gras polyinsaturé est en accord avec le fait que la formation des peroxydes cycliques est simultanée à la conjugaison des dienes (63). Des études ultérieures sur la peroxydation de l'acide linolénique ont montré une augmentation du test à ATB, parallèle à celle de la concentration en peroxyde déterminée, soit par absorption ultraviolette (232 mμ), soit iodométriquement (132) (34). UGAZIO et GABRIEL (41) ont analysé la cinétique de la peroxydation lipidique de l'acide linoléique après irradiation ultraviolette, à l'aide de trois méthodes : détermination des dienes conjugués, formation des hydroperoxydes (méthode de STAMM) et détermination des produits de la réaction à ATB. L'isomérisation précède la formation des hydroperoxydes (Figure 2). Successivement l'absorption à 233 mμ et la concentration en hydroperoxydes diminuent; par contre la valeur du test à ATB augmente et est maximale au bout de 48 heures.

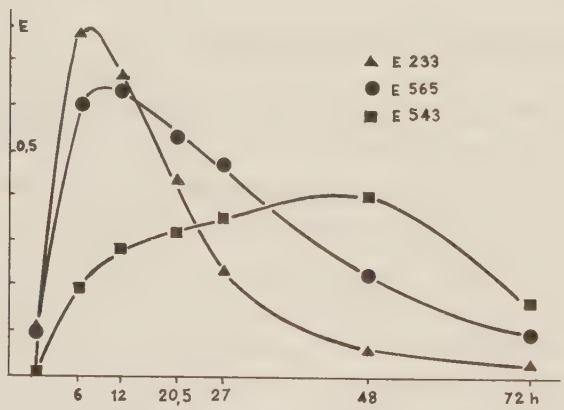



FIGURE 2 - Variations dans le temps de l'isomérisation de l'acide linoléique (E 233), de la formation des hydroperoxydes (E 565) et de la dégradation de l'acide gras (E 543) : réaction avec l'acide thiobarbiturique). (41).

Abscisse : temps d'exposition aux UV.

Ordonnée : valeurs des extinctions.

- Lipides tissulaires.

Les techniques de détermination des peroxydes tissulaires sont plus délicates à définir. En ce qui concerne la méthode la plus répandue utilisant l'acide thiobarbiturique (ATB), les avis des auteurs sont nettement partagés.

Pour DAHLE et coll. (63),la réaction à ATB de lipides tissulaires varie avec le profil des acides gras polyinsaturés.

A des taux identiques d'autoxydation, un tissu riche en acides gras hautement insaturés développera une réaction à ATB supérieure à celle d'un tissu riche en acides moins insaturés (63). De plus MAY et Mc CAY (133) signalent que le test ATB seul ne permet pas de connaître l'état de peroxydation d'un corps;il n'indique que la quantité des produits de dégradation et ne renseigne pas sur l'intensité de la peroxydation. Ces auteurs montrent que,durant l'oxydation enzymatique des acides gras insaturés des phospholipides, il y a consommation d'oxygène et formation d'une petite quantité seulement de malonaldéhyde. Dans le système microsomial, 3 p. 100 seulement des acides gras transformés libèrent des molécules de malonaldéhyde (49).

Pour KENASTON et coll. (131), le test ATB apparaît être une méthode valable d'estimation des produits d'oxydation des acides linoléique et linolénique des tissus.

WILLS (113) étudiant l'oxydation de l'acide linolénique en présence d'homogénats tissulaires, accorde sa préférence au test ATB. Il montre, en effet, que les valeurs fournies par la consommation d'oxygène sont inférieures à celles données par l'acide thiobarbiturique. Ceci peut s'expliquer par un raccourcissement de la chaîne en l'absence d'oxygène pour donner des fragments qui réagissent avec ATB (113). La mesure de cette peroxydation en présence d'acide ascorbique,évaluée par étude de la consommation d'oxygène ou par mesure du test à ATB,est différente : l'augmentation du test à ATB dépasse celle de la consommation d'oxygène. Il est possible que l'acide ascorbique catalyse la libération du malonaldéhyde réagissant avec ATB (113). En effet la méthode à ATB ne mesure pas la quantité de peroxydes présents mais les produits ultérieurs de la peroxydation. Cette dernière valeur doit, selon WILLS et WILKINSON (35) être prise en considération parce qu'elle reflète la dégradation due à la peroxydation.

L'ensemble de ces considérations souligne l'importance de la discrimination de la technique de dosage qu'on désire utiliser. Toutes les techniques décrites ne dosent pas le même composé mais des étapes différentes dans le mécanisme peroxydatif des lipides.

4 - FACTEURS BIOCHIMIQUES DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE.

a) Influence de l'état du substrat.

- Effet de la concentration en tissu.

Différents auteurs ont étudié les relations entre la peroxydation lipidique et la concentration tissulaire.

En 1963, BERNHEIM (134) a montré que les peroxydes lipidiques diminuent à partir d'une certaine concentration en tissu cérébral. Les faibles peroxydations pour de fortes concentrations tissulaires seraient expliquées par la liaison d'une quantité plus importante de fer à la protéine. WILLS (113),étudiant la peroxydation de l'acide

linoléique en présence d'homogénats de tissus de rats ,démontre l'action stimulatrice des suspensions tissulaires diluées et l'action inhibitrice des suspensions de concentration supérieure à 4 %. Cet effet de la concentration de l'homogénat sur la peroxydation des acides gras dépend du pH, les homogénats concentrés étant plus actifs en solutions acides mais peu influents en solutions de pH voisin de la neutralité.

- Effet de la concentration en lipide.

WILLS et ROTBLAT (34) ont signalé une peroxydation lipidique beaucoup plus importante lorsque la concentration lipidique est faible (de l'ordre de 2 mg/ml d'émulsion) que dans le cas d'une concentration supérieure. BERNHEIM (134) a montré l'inhibition de la formation de peroxydes dans les mitochondries par des concentrations d'acide oléique de l'ordre de 1 µMole/ml.

- Effet de l'état du lipide.

WILLS et ROTBLAT (34) étudiant l'irradiation de lipides tissulaires chez le rat, a mis en évidence une peroxydation lipidique beaucoup plus élevée dans les lipides émulsionnés que dans les lipides à l'état sec : ce phénomène est observé pour toutes les doses étudiées.

- Effet de la richesse en acides gras insaturés.

La peroxydation lipidique se produisant sur les doubles liaisons des acides gras, WILLS et ROTBLAT (34) ont mesuré le degré d'insaturation de lipides extraits à partir de divers tissus et étudié simultanément la formation de peroxydes lipidiques après irradiation. Leur conclusion est que dans le cas général, il n'y a pas de corrélation entre l'indice d'iode et la peroxydation lipidique.

- Effet de l'agent émulsifiant.

Les lipides tissulaires se peroxydent beaucoup plus à l'état d'émulsions qu'à l'état sec (34). Plusieurs agents émulsifiants sont essayés ; nous pouvons citer le dodécyl-sulfate de sodium, le stéarate de sodium, le desoxycholate de sodium . WILLS et ROTBLAT (34) ont montré que le dodécyl-sulfate de sodium est l'agent émulsifiant le plus intéressant. De plus la formation de peroxydes lipidiques dépend de la concentration en dodécyl-sulfate de sodium et est maximale aux valeurs comprises entre 1,0 et 7,5 mg/ml. L'interprétation de l'action de ces agents émulsifiants est difficile à établir.

SCHULMAN et COCKBAIN (135) ont suggéré l'alignement des molécules d'agent émulsifiant et de lipides en ordre bien précis à la surface de la micelle. Les doubles liaisons des lipides sont alors facilement attaquées par les radicaux oxydants formés en phase aqueuse. L'action catalytique du desoxycholate sur la peroxydation lipidique suggère que la structure de la membrane lipoprotéique est rompue de telle sorte que la peroxydation peut débuter plus rapidement (136).

b) Influence du pH.

Tous les travaux concernant les relations entre la peroxydation lipidique et les valeurs de pH rapportent des pH optima acides ou voisins de la neutralité.

BERNHEIM (134) et BARBER (137) ont montré que les facteurs qui favorisent la libération du fer, tels par exemple des pH bas, entrainent un accroissement de la peroxydation lipidique. La dissociation du complexe protéine-fer serait donc favorisée par des pH bas et inhibée par des pH élevés.

WILLS et ROTBLAT (34), étudiant la peroxydation des lipides hépatiques et des acides gras irradiés, démontrent qu'elle est maximale à pH 7,0 et qu'elle diminue en solutions alcalines.

Une émulsion de l'acide gras ou du lipide dans la phase aqueuse étant indispensable à la peroxydation, les pH acides diminueraient la stabilité des émulsions (34). Cependant des pH inférieurs ou égaux à 4,0 accroissent la peroxydation (34), ce qui confirme l'effet stimulateur de faibles pH décrit par BERNHEIM (134).

WILLS (113) a établi une relation entre l'effet de la concentration de l'homogénat et celui du pH sur la peroxydation lipidique. C'est ainsi qu'à pH 6,0 le taux de peroxydes d'émulsions d'acides gras catalysées par des homogénats de foie augmente avec la concentration de l'homogénat jusqu'à une concentration finale de l'homogénat de 4 %. A pH 7,4, la peroxydation lipidique catalysée par une concentration en homogénat supérieur à 1 % est plus faible que celle catalysée par des homogénats à 1 %. Cette dépendance du pH à l'égard de la concentration est à rapprocher des résultats de BERNHEIM (134). L'activité catalytique des homogénats en milieu acide serait due au fer non héminique. En effet l'oxydation catalysée par le fer non héminique dépend du pH et est prépondérante en milieu acide.

c) Influence des effecteurs.

- Action de l'acide ascorbique.

Des homogénats de tissus incubés en présence d'acide ascorbique forment beaucoup plus de peroxydes qu'en son absence (138). OTTOLENGHI (105) a montré que des suspensions mitochondriales de foie de rat forment des peroxydes lipidiques en présence de faibles concentrations d'acide ascorbique.

L'oxydation simultanée de l'acide ascorbique et des acides gras insaturés serait catalysée par un ion métallique. ROBINSON (139) a étudié l'influence de l'acide ascorbique sur la turbidité et sur la peroxydation lipidique des microsomes de cerveau de rat. L'addition d'acide ascorbique aux suspensions microsomiales s'accompagne d'une diminution de la turbidité du milieu et d'une formation accrue des peroxydes lipidiques.

WILLS (113) montre que pour des homogénats de différents tissus l'acide ascorbique accroît le taux de peroxydation des acides gras insaturés en solutions de pH inférieur à 6,0 et l'inhibe si le milieu est plus alcalin. Lorsque la ferritine est présente dans un tissu, l'acide ascorbique peut avoir un double rôle : d'abord relâcher le fer de la ferritine, ensuite former un système catalyseur actif avec le fer.

L'acide dehydroascorbique est un agent de peroxydation plus faible que l'acide ascorbique (140).

- Action de l'hémoglobine.

La présence des composés hématiques dans de nombreux tissus a incité plusieurs auteurs à entreprendre l'étude de l'influence de l'hémoglobine sur la peroxydation des lipides.

L'oxydation des acides gras en peroxydes peut être catalysée par des composés tels que l'hème à très faible concentration (141) (142) (143).

L'effet de l'hémoglobine sur le taux de peroxydation d'une émulsion d'acide linoléique dépend du rapport (concentration en hémoglobine/concentration en acide linoléique)(144). C'est ainsi que des solutions diluées d'hémoglobine ($4.10^{-6}$M) catalysent une oxydation rapide d'acide gras insaturés,mais des solutions concentrées ($4.10^{-5}$M) inhibent cette même oxydation.

KENDRICK et WATTS (145) envisagent un mécanisme possible de l'effet antioxydant des hémoprotéines; il est basé sur la formation de complexes stables (hème-peroxyde) durant les premières étapes de l'oxydation.

Les homogénats de foie, de coeur et de rate de rat ont un comportement semblable à celui des solutions d'hémoglobine; en effet ils sont des activateurs en suspensions diluées (0,5%), des inhibiteurs à de fortes concentrations (144).

WILLS (113),plus tard,étudiant l'action de l'hémoglobine sur des homogénats de poumons,montre une élévation de la peroxydation lipidique si la concentration d'hémoglobine est inférieure à 10 $\mu$M et une inhibition de cette peroxydation à des concentrations supérieures à 50 $\mu$M.

L'oxydation catalysée par les hémoprotéines est peu affectée par le pH (113).

- Action des ions.

Le rôle d'activateur joué par les ions $Fe^{++}$ vis à vis de la peroxydation lipidique a été noté par de nombreux auteurs. En utilisant comme milieu cellulaire les mitochondries de foie de rat, OTTOLENGHI (105) a montré que les ions $Fe^{++}$, à de très faibles concentrations, augmentaient le taux de formation de peroxydes lipidiques. Il existe une proportionalité étroite entre la quantité de peroxydes formés et la concentration en ions $Fe^{++}$ ajoutés. L'activation par les ions $Fe^{++}$ a été aussi établie par HUNTER et coll. (146) sur les mitochondries de foie de rat, puis par Mc KNIGHT et coll. (147). Ces derniers auteurs montrent que l'incubation de suspensions diluées de mitochondries de foie de rat en présence de 10 à 50 $\mu$M $Fe^{++}$ réside en la formation de peroxydes lipidiques, en la chute de la turbidité et en la perte de protéines et lipides mitochondriaux. Les effets des ions $Fe^{++}$ ne sont pas inhibés par un abaissement de la température à 0°. Entre 1 et 10 $\mu$M $Fe^{++}$, la coloration est proportionnelle à la quantité de fer (146).

ROBINSON (139),étudiant les changements structuraux des suspensions microsomiques de cerveau de rat, montre que ces changements sont en relation avec la peroxydation lipidique ; celle-ci est accrue par l'adjonction d'ions $Fe^{++}$ et $Fe^{+++}$ au milieu. Selon Mc KNIGHT et HUNTER (148), les ions $Fe^{+++}$ agiraient par intensification de la couleur, par formation d'un complexe métallique avec le chromophore. Par contre, les ions $Fe^{+++}$ sont sans action sur l'intensité de coloration d'un témoin de malonaldéhyde (148).

Par ailleurs, l'addition à des milieux d'incubation d'ions bivalents autres que les ions $Fe^{++}$, tels les chlorures de cuivre, de manganèse, de colbat et de mercure, n'entraîne pas de peroxydation lipidique significative (139). Il s'en suit que le métal nécessaire est le fer. L'oxydation catalysée par le fer dépend du pH et est prépondérante en milieu acide (113).

Le rôle indispensable des ions $Fe^{++}$ est confirmé par l'action d'agents chélateurs, et en particulier par l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (EDTA). L'addition d'EDTA à des mitochondries de foie de rat inhibe totalement la formation de peroxydes lipidiques (105) (147). ROBINSON (139), dans les microsomes de cerveau, a signalé l'inhibition complète de la peroxydation lipidique par l'EDTA, à des concentrations variant de 10µM à 1mM. La peroxydation de l'acide linolénique,catalysée par des homogénats de rein et de foie,est fortement inhibée par l'EDTA (0,2 mM), alors que dans des homogénats de coeur et de rate, l'inhibition est plus faible (113).

Des agents chélateurs autres que l'EDTA, tels que l'O-phénanthroline, la desferrioxamine et le 8-hydroxy-quinoline, sont des inhibiteurs puissants de la peroxydation lipidique (37). C'est ainsi que l'addition d'O-phenanthroline à des suspensions de microsomes avant incubation avec le NADPH inhibe presque complètement la formation de peroxydes lipidiques. L'inhibition causée par l'addition du chélateur devient moins importante, lorsque la dose d irradiation est supérieure à 50 K rads (37).

L'EDTA est un inhibiteur très puissant de la peroxydation des acides gras insaturés catalysée par le fer,mais n'a pas d'effet sur la peroxydation catalysée par les hémoprotéines (130).

L'action de l'EDTA confirme le rôle essentiel joué par le fer non héminique dans le processus de peroxydation lipidique (149).

- Action de la composition de l'atmosphère.

Au cours de l'irradiation des fractions subcellulaires de foie de rat, WILLS et WILKINSON (36) ont montré que la formation de peroxydes lipidiques n'est pas modifiée par la composition gazeuse de l'atmosphère durant l'irradiation,mais que l'oxygène est essentiel durant la période de post-irradiation.

Cette action stimulatrice de l'oxygène sur la peroxydation lipidique est confirmée par l'effet d'antioxydants. En effet, la formation de peroxydes lipidiques des tissus dépendrait du contenu du tissu en tocophérol et autres antioxydants (32) (45).

C'est ainsi que JACOB et LUX (43) ont noté une relation étroite entre l'hémolyse induite par l'eau oxygénée chez les rats déficients en vitamine E et la peroxydation lipidique. La vitamine E est bien connue comme un antioxydant et un agent de protection contre la formation de peroxydes lipidiques (150) (151) (152). WILLS et WILKINSON (35) ont montré que l'addition de vitamine E avant l'irradiation à des suspensions mitochondrio-lysosomiques entraîne une diminution de la concentration en peroxydes dans les échantillons témoins et abolit l'augmentation de la peroxydation causée par l'irradiation. L'addition de vitamine E à des suspensions microsomiques immédiatement après l'irradiation inhibe fortement leur peroxydation (37).

- Action de l'adenosine diphosphate.

Les nucléotides à adénine et tout particulièrement l'ADP accélèrent le taux de peroxydation des microsomes incubés en présence d'acide ascorbique (46). HOCHSTEIN et coll. (153) trouvent que l'effet stimulateur de l'ADP dépend de la présence de fer dans les nucléotides.

WILLS (37),étudiant la peroxydation de microsomes irradiés, montre que l'ADP accélère la peroxydation des suspensions témoins,mais que son effet est réduit dans les échantillons irradiés.

- Action des protides.

L'effet protecteur in vivo de substances à groupements thiols contre les méfaits de l'irradiation est connu depuis longtemps. Par analogie avec cet effet, différents auteurs ont étudié l'action des protéines sur la peroxydation lipidique in vitro. MEAD (8) analyse l'influence de la cysteine sur l'acide linoléique irradié; c'est ainsi que de faibles concentrations de cysteine ($2.10^{-4}$M) diminuent considérablement l'oxydation de cet acide.

La formation de peroxydes lipidiques d'homogénats de cerveau de rat est inhibée par l'adjonction,au milieu,de sérum de vertébrés (154). Chez le rat, l'inhibiteur est une protéine liée au fer, supposée être la siderophiline; cet inhibiteur agirait par chélation. De plus PLACER et Coll. (155) (156) ont trouvé dans le sérum d'animaux et de l'homme un inhibiteur de la lipoperoxydation localisé principalement dans les $\alpha_2$-globulines. Par ailleurs,PLACER et coll. (157),montrent que l'inhibition de la lipoperoxydation par le sérum n est pas due à la transferrine, car cette dernière active l'oxydation aussi bien in vivo qu'in vitro.

La gélatine inhibe complètement la peroxydation lipidique d'une émulsion irradiée ; la sérum albumine la réduit à 11 % de celle du témoin (34).

L'influence du glutathion sur la peroxydation lipidique est également envisagée. Le glutathion oxydé n'a pas d'action (113). L'addition du glutathion réduit (GSH) à des homogénats de rate, de poumon, de foie ou de coeur, cause l'inhibition de la peroxydation des acides linoléique et linolénique. Inhibiteur pour une concentration d'1 mM, le glutathion devient activateur à des concentrations supérieures à 2 mM. Ceci montre que de faibles concentrations de GSH inhibent la peroxydation catalysée par les hémoprotéines, alors que des concentrations plus élevées entraînent un accroissement de la peroxydation catalysée par le fer non héminique (113).

La concentration de glutathion nécessaire pour causer une inhibition ou une stimulation de la peroxydation varie donc avec le tissu utilisé et avec les conditions expérimentales. C'est ainsi que les effets du glutathion augmentent avec le pH (113).

CHRISTOPHERSEN (158) montre que des composés thiols,tels que la cystéine ou le glutathion,inhibent la formation de peroxydes de microsomes incubés en présence de NAPDH. Cet auteur suggère une réaction du GSH avec les peroxydes (158) (159).

L'effet du glutathion est total s'il est ajouté après l'irradiation,mais il est beaucoup plus faible s il est introduit avant l'irradiation (37).

L'inhibition de la peroxydation lipidique causée par les protéines en général peut-être rapprochée de la formation d'un complexe sérumalbumine-malonaldéhyde observé par KWON et BROWN (160) et par BUTTKUS (161). Ces complexes feraient intervenir les groupements aminés libres de la protéine et le groupement carbonyl de l'aldéhyde. CRAWFORD et coll. (162) observent un phénomène analogue avec la myosine.

## II - ETUDE METABOLIQUE DES LIPIDES PEROXYDES.

### 1 - DEVENIR DES PRODUITS DE LA PEROXYDATION LIPIQIDUE.

Dans la première partie de notre étude bibliographique, nous avons signalé de nombreux facteurs inducteurs de la peroxydation lipidique ; il s'agit donc d'un processus assez répandu.

Dès lors, se pose le problème du devenir métabolique des lipides peroxydés et de leurs produits de dégradation. Nous avons vu que la peroxydation lipidique s'accompagne de la formation de trois groupes principaux de dérivés d'oxydation, tout d'abord des produits primaires, les hydroperoxydes, puis les epoxyacides, les hydroxyacides, les composés carbonylés et les diacides, enfin les polymères.

Successivement nous envisagerons les travaux concernant le devenir des lipides peroxydés, ensuite celui du malonaldéhyde, aldéhyde à 3 atomes de carbone qui est un des nombreux composés carbonylés associés à la dégradation oxydative des lipides, et enfin celui de l'acide azélaïque, produit d'oxydation de l'acide nonanal-9-oïque.

Nous éliminerons de cette étude métabolique les aldéhydes autres que le malonaldéhyde, les acides epoxydés et hydroxylés et les produits de la polymérisation.

#### a) hydroperoxydes.

Depuis les études de DUBOULOZ et coll. (163) (164) (165) (166) (167),on sait que les peroxydes lipidiques sont détruits par un pigment hématique ; c'est pourquoi leur présence ne peut être décelée qu'à l'état de traces.

FREEMAN (168) utilisant l'hydroperoxyde de l'acide l-$^{14}$C linoléique, l'administre à des rats, soit par injection, soit per os, et analyse les lipides du contenu intestinal, de la muqueuse, du foie et du sérum.

Le contenu intestinal et la muqueuse intestinale des rats montrent peu ou pas de radioactivité.

Par contre dans le foie et dans le sérum,les triglycérides, les phospholipides, les acides gras non oxydés et le cholestérol sont radioactifs. Le marquage des acides gras et du cholestérol indique que l'hydroperoxyde de l'acide linoléique a subi une β-oxydation et une nouvelle synthèse ; ce fait est confirmé par la présence des acides palmitique et laurique radioactifs.

Ces résultats montrent que les hydroperoxydes sont dans une large mesure dégradés avant leur incorporation dans les lipides tissulaires. La distribution du peroxyde lipidique dans les différentes classes lipidiques est semblable à celle d'un acide gras non oxydé (168).

Selon FREEMAN (168), les peroxydes sont plus toxiques par voie parentérale que par voie orale. Par ailleurs, l'ingestion de traces d'hydroperoxyde de l'acide 1-$^{14}$C linoléique à des rats s'accompagne de sa rapide destruction dans le tractus gastro-intestinal.

O'BRIEN et FRAZER (169) supposent que la muqueuse intestinale est le lieu principal de la dégradation des hydroperoxydes.

L'étude du métabolisme des peroxydes lipidiques a été ensuite reprise par FREEMAN et O'BRIEN (170),qui analysent les produits d'hydrolyse des triglycérides hépatiques. Les autoradiogrammes montrent que la radioactivité se répartit dans les acides gras libres (42 %), dans les produits de rupture (25 %) , dans les produits de polymérisation et dans les monoglycérides (31 %). Trois pour cent seulement subsistent sous forme d'hydroperoxydes.

La distribution de la radioactivité est indépendante du mode d'administration du peroxyde (170).

La chromatographie en phase gazeuse combinée aux mesures de radioactivité montre l'absence de radioactivité des acides à dix huit atomes de carbone.

Ceci entraîne la conclusion que le métabolisme du peroxyde de l'acide linoléique ne nécessite pas sa conversion directe en acide linoléique,mais plutôt en intermédiaires,métabolisés par un mécanisme identique à celui d'un acide non oxydé.

Parmi les produits de décomposition obtenus in vitro, FREEMAN et O'BRIEN (170) signalent,à titre d'hypothèse,des acides dicarboxyliques, des epoxyacides, des acides cétoniques, des mono-, et di-hydroxyacides, ainsi que des esters de ces acides, des semialdéhydes et des composés polymères de forte polarité.

b) Malonaldéhyde.

La dégradation oxydative des lipides est suivie de la formation de composés carbonylés, dont un dialdéhyde à trois atomes de carbone, le malonaldéhyde.

L'étude de son métabolisme in vivo a suscité un certain intérêt.

C'est ainsi que CRAWFORD et coll. (171) ont déterminé la dose léthale moyenne (LD 50) du malonaldéhyde chez le rat. Pour cette étude ils utilisent,non le malonaldéhyde sous sa forme libre, à cause de son instabilité et de sa grande réactivité, mais le tétra-ethoxypropane. Les auteurs signalent des proportions d'absorption intestinale allant de 7 à 32 % pour les doses léthales, de 11 à 50 % pour les doses non léthales.

PLACER et coll. (120) traitent du métabolisme du malonaldéhyde. L'étude porte sur des rats albinos ; le malonaldéhyde est administré sous forme libre, et déterminé dans les tissus, dans le sérum et dans les urines. Les résultats montrent que le malonaldéhyde est en partie métabolisé, en partie excrété dans l'urine, alors qu'il disparaît rapidement du sérum. Les concentrations en malonaldéhyde diffèrent suivant

les organes, en relation avec son oxydation.

Ces données signifient que le malonaldéhyde est très rapidement métabolisé. PLACER et coll. (120) arrivent à l'hypothèse que le malonaldéhyde intervient dans le métabolisme par formation de malonyl CoA, qui occupe une place importante dans la synthèse des acides gras.

CRAWFORD (172) signale également que le malonaldéhyde, ingéré par des rats sous forme de tétra-ethoxypropane, est largement transformé et n'est plus détecté par sa réaction avec l'acide thiobarbiturique. Il serait surtout présent dans le sang, et plus particulièrement dans les erythrocytes, où il réagirait in vivo avec les protéines, peutêtre avec l'hémoglobine. De plus le malonaldéhyde ingéré entraîne des nécroses des cellules parenchymateuses.

Cet auteur pense que le malonaldéhyde ingéré exerce une action toxique directe et une interaction avec certains constituants de l'alimentation, altérant ainsi leur valeur nutritionnelle.

c) Acide azélaïque.

Le métabolisme de l'acide azélaïque a fait l'objet d'études surtout chez les microorganismes.

Ainsi JANOTA-BASSILIK et WRIGHT (173) rapportent l'utilisation, par une souche de Pseudomonas, de l'acide azélaïque comme seule source de carbone et sa dégradation en acide pimélique. De même chez Micrococcus, OGATA et coll (174) signalent la production d'acide pimélique à partir d'acide azélaïque. Chez Pseudomonas, les dérivés de l'acide azélaïque seraient des précurseurs de l'acide lipoïque (175). OGATA et coll. (176) mettent en évidence, chez Micrococcus, la production d'acide α-cétoglutarique à partir d'acide azélaïque.

Chez Pseudomonas, le n-undecane se convertit en acide azélaïque par oxydation des deux méthyles terminaux et par β-oxydation ; de plus l'addition d'acide azélaïque à des hydrocarbures en présence de Pseudomonas accroît la production de biotine.

Ces travaux signifient que l'acide azélaïque ches les êtres inférieurs peut se métaboliser, et, en particulier, peut subir la β-oxydation.

Récemment GREUB et BERNHARD (177) ont isolé de l'urine du chien et de l'homme normaux de l'acide azélaïque. L'homme en excrète 18 à 20 mg par jour ; par contre l'urine du rat n'en contient pas.

Ceci nous conduit à traiter du devenir de ce diacide chez les êtres supérieurs. A notre connaissance peu de travaux en font état.

Après injection d'acide azélaïque à des chiens phloridzinés, BAER et BLUM (178) récupèrent 50 % du produit dans l'urine.

Toujours chez le chien, SMITH (179), ajoutant à leur alimentation une grande quantité d'acide azélaïque (20 à 45 g), montre que cet acide est peu utilisé par l'animal et n'est pas excrété dans les fèces; 60 % en moyenne de l'acide ingéré sont retrouvés dans l'urine.

Le problème de l'oxydation possible des acides dicarboxyliques, l'acide azélaïque en particulier, fait l'objet d'opinions diversement partagées.

Selon FLASCHENTRÄGER (180), les acides dicarboxyliques à moyenne chaîne sont moins susceptibles d'être oxydés in vivo que les acides gras ; leur dégradation ne se ferait pas par β-oxydation. En effet les enzymes de la β-oxydation seraient inhibés par la présence du deuxième groupement carboxylique ; ceci est prouvé par la dissimulation du groupement

carboxylique en 1 dans l'acide sébacique par conversion en amide,qui rend l'acide beaucoup plus sensible à l'oxydation in vivo. Après injection à deux lots d'animaux des acides sébacique et sébamique par voie sous cutanée sous forme de sels de sodium, l'urine du premier lot d'animaux renferme 61 % d'acide sebacique contre 10 % d'acide sebamique dans le deuxième lot.

MAZZA (181) observe l'oxydation des acides dicarboxyliques, l'acide azélaïque notamment, par des coupes de foie et de rein et pense que les acides dicarboxyliques subissent le mécanisme de β-oxydation décrit par KNOOP.

BERNHARD (182) montre à l'aide du deutérium que l'acide succinique est métabolisé par les rats et les chiens, alors que les acides dicarboxyliques à chaîne plus élevée ne le sont pas.

BLOOR (183) suggère qu'il est improbable qu'une β-oxydation directe de ces acides survienne.

Alors que les peroxydes lipidiques, tels l'hydroperoxyde de l'acide linoléique, subissent la β-oxydation lorsqu'ils sont incubés avec des mitochondries et certains cofacteurs, les produits secondaires d'oxydation,formés par décomposition du peroxyde, subissent seulement une β-oxydation partielle (184).

## 2 - ACTION BIOCHIMIQUE DES PEROXYDES LIPIDIQUES.

### a) Action sur les membranes.

La peroxydation lipidique conduisant à la rupture des chaînes d'acides gras insaturés, la formation de peroxydes lipidiques s'accompagnera d'une altération des composés structuraux essentiels, tels que les lipoprotéines des membranes,entrainant la libération de constituants cellulaires.

PACQ et ALEXANDER (185) ont suggéré que les dégats secondaires aux radiations ionisantes sont dus à une rupture de l'organisation cellulaire,de sorte que les enzymes viennent en contact des substrats,dont ils sont séparés dans les cellules normales.

L'action des peroxydes lipidiques sur les cellules hépatiques a été mise en évidence par WARAVDEKAR et coll. (186) et par Mc KNIGHT et coll (147). Ces auteurs ont observé le gonflement et la lyse des mitochondries hépatiques isolées de rat, ainsi que la baisse de leur teneur en protéines et en lipides sous l'effet des lipidoperoxydes. Les mitochondries et le réticulum endoplasmique, particulièrement riches en acides gras insaturés, sont les principaux lieux de la peroxydation lipidique (147). De nombreux auteurs ont signalé la détérioration des mitochondries par les peroxydes lipidiques et les répercussions sur certains enzymes mitochondriaux (151) (147) (187).

WILLS et WILKINSON (35) ont montré que la libération de phosphatase acide et de β-glycuronidase des lysosomes résulterait de la formation de peroxydes dans la membrane. Ils concluent que la peroxydation lipidique est la principale cause des dommages entraînés aux lysosomes par l'irradiation.

Outre les membranes lysosomiques et mitochondriales, les membranes globulaires sont aussi altérées par les peroxydes lipidiques. JACOB et LUX (43) ont mis en évidence l'attaque des membranes globulaires par l'eau oxygénée. La perte des groupements thiols

membranaires augmente la perméabilité cellulaire et conduit ainsi à une hémolyse.

La peroxydation lipidique par incubation de microsomes avec l'acide ascorbique ou le NADPH cause une rupture partielle de membranes avec une perte concomitante du pouvoir d'hydroxylation (188) (189). WILLS et WILKINSON (189) considèrent que la peroxydation induite par l'irradiation entraîne la désintégration des membranes lipidiques essentielles au système de transport des électrons. Ils concluent que le défaut d'hydroxylation résulte de l'altération partielle des membranes. La rupture de la membrane entraînerait des dégâts cellulaires par suite de cette diminution des oxydations.

b) Action sur les constituants cellulaires.

A cette action des peroxydes lipidiques sur les membranes cellulaires, se juxtapose leur effet toxique sur les constituants vitaux cellulaires, par exemple l'inactivation d'enzymes de la chaîne respiratoire et l'altération des membranes globulaires.

Depuis les travaux de BERNHEIM et coll. (190),on sait que le linoléate de méthyle, exposé aux ultraviolets,inhibe les enzymes de la respiration ; cette inhibition procède lentement ; elle est directement proportionnelle à la quantité d'acide gras oxydé ajoutée au milieu d'incubation (191). Le peroxyde d'oléate d'éthyle est capable d'oxyder les groupements -SH des protéines en groupements disulfures et en produits d'oxydation ultérieurs (166) (192).

L'irradiation de la succinate-deshydrogénase,à une dose de 5000 roentgens en présence d'une émulsion d'acides gras insaturés,cause la destruction de 66 % de l'activité enzymatique (9). L'irradiation des enzymes à groupements thiols par les peroxydes lipidiques a été surtout étudiée par WILLS (193). De nombreux enzymes tels que l'uréase, la glyoxalase et la papaïne sont inhibés par des émulsions d'acides gras insaturés oxydés. La nature des enzymes inhibés d'une part, l'effet protecteur des composés à groupements thiols, cystéine et glutathion par exemple, d'autre part, montrent que les groupements -SH des enzymes sont les cibles de l'inhibition peroxydative. Il est toutefois possible que les produits les plus toxiques soient les radicaux libres formés durant la peroxydation lipidique et non les peroxydes eux-mêmes. La localisation des acides gras insaturés sur les membranes cellulaires, comme constituants des phospholipides, entraînerait,pour ces acides insaturés,un rôle important dans le contrôle métabolique (193).

La toxicité des peroxydes lipidiques résulte de l'oxydation des groupements thiols des protides (194) (113) (195). Les peroxydes lipidiques, en dénaturant les acides aminés des systèmes enzymatiques, participent à l'altération des supports des caractères héréditaires (196). La destruction des groupements thiols par les peroxydes d'acide gras est accompagnée de celle des peroxydes eux-mêmes (194).

Selon NARAYAN et KUMMEROW (89), tous les lipides saturés ou insaturés oxydés semblent dénaturer les protéines en formant des complexes lipides oxydés-protéines différents des lipoprotéines naturelles (89).

TAPPEL (197), puis HOCHSTEIN et ERNESTER (198) ont rapporté l'irradiation de cytochromes mitochondriaux.

L'addition d'acide linolénique peroxydé à du cytochrome c provoque l'altération de ce dernier par oxydation des acides aminés (88).

O'BRIEN (184) signale l'inhibition de la respiration mitochondriale secondaire à la

destruction du cytochrome c par l'hydroperoxyde de l'acide linoléique. FRAZER (199) met en évidence un phénomène analogue, accompagné d'une dénaturation sélective des β-lipoprotéines membranaires. Ce type d'interaction pourrait représenter une étape déterminante dans l'apparition de l'athérosclérose (199) (200).

L'addition de l hydroperoxyde du linoléate de méthyle à des mitochondries du foie de rat diminue les phosphorylations mitochondriales (201). Le même résultat est obtenu après irradiation des mitochondries par un accélérateur d'électrons (202). Par contre, l'addition d'α-tocophérol au milieu prévient presque complètement l'effet inhibiteur des peroxydes (201). Cette action destructive du cytochrome c par les peroxydes lipidiques, comme le prouve la disparition rapide du pic de Soret du cytochrome (169), serait due à une polymérisation de la protéine (169). Ainsi les peroxydes lipidiques causent des dégâts au cytochrome c, qui ne peut jouer son rôle dans le transport des électrons (169) (203).

De plus O'BRIEN et GREEN (203) montrent l'inactivation de l'isocitrico-deshydrogénase mitochondriale par l'hydroperoxyde de l'acide linoléique.

L'influence des peroxydes lipidiques sur la respiration cellulaire des tissus tumoraux a fait également l'objet de recherches. C'est ainsi que SHUSTER (204) montre que l'addition de petites quantités d'extraits aqueux de linoléate de méthyle oxydé entraîne une diminution de l'activité respiratoire des cellules d'ascites d'Ehrlich ; cette diminution est par ailleurs fonction de la concentration de l'extrait en composés hydrosolubles. Par la suite BAKER et WILSON (40) signalent que ces inhibiteurs migrent en chromatographie en couche mince avec les aldéhydes, les hydroperoxydes et les composés réagissant à l'acide thiobarbiturique. Aucun composé isolé n'inhibe la respiration tumorale , mais, par contre, leur ensemble cause l'inhibition complète de la respiration des cellules tumorales.

L'action des peroxydes lipidiques sur les constituants cellulaires diffère de celle de l'eau oxygénée (169). L'oxydation des groupements thiols est beaucoup plus rapide par les peroxydes lipidiques que par le peroxyde d'hydrogène (205). Cependant la réactivation des enzymes thioliques inactivés par l'eau oxygénée est effectuée comme dans le cas de l'inactivation par les peroxydes lipidiques, par de petites quantités de composés thiols (206).

Si la plupart des travaux ont porté sur les mitochondries, certains auteurs (207) ont montré que les groupements -SH des microsomes sont détruits par irradiation, La destruction des membranes du réticulum endoplasmique est certes très néfaste aux fonctions cellulaires (188).

Les membranes globulaires sont aussi le siège d'une attaque par les peroxydes lipidiques. Le rôle du glutathion dans l'hémolyse est controversé. Certains (208) pensent qu'il n'est pas en relation avec une hémolyse éventuelle. Pour MYERS et BIDE (38), SUTHERLAND et coll. (209) SHAPIRO et KOLLMANN (210), SUTHERLAND et PIHL (39), l'irradiation d'hématies conduit à une perte du glutathion intracellulaire simultanément à la peroxydation des lipides membranaires et à l'augmentation de la perméabilité au potassium. Cette perte des groupements -SH est principalement due à la destruction partielle de la barrière, entraînant une perte de potassium. L'altération de cette membrane implique l'oxydation des groupements -SH de la membrane (211). La dégradation de l'hémoglobine et de l'hème, en présence de lipides insaturés, avec perte de la coloration caractéristique

de l'hémoglobine,est due aux propriétés oxydatives des hydroperoxydes plutôt qu'aux radicaux libres formés (212). Cette destruction de l'hème est à rapprocher de celle qui est induite par l'eau oxygénée (213).

Outre l'action inhibitrice des peroxydes lipidiques sur les enzymes, MOCHALINA (214) observe l'inhibition de la division de la paramécie par la présence, dans le milieu,des produits d'oxydation de l'acide linolénique irradié par le $^{60}CO$.

La toxicité des peroxydes serait due à leur action destructive sur les acides aminés et les vitamines, à leur pouvoir dénaturant à l'égard des protéines et à leur action sur l'hème et les acides nucléiques (215).

# T E C H N I Q U E S

## ACTION DES RAYONS X SUR LE SANG

I - Effet sur les lipoprotéines plasmatiques lyophilisées.

A - Mise en évidence des altérations lipidiques.

1 - Préparation des lipoprotéines
2 - Conditions d'irradiation
3 - Extraction et fractionnement des lipides
4 - Dosages :
    a) dosage du malonaldéhyde,
    b) dosage des lipides totaux,
    c) dosage du phosphore lipidique,
    d) dosage des acides gras estérifiés.
5 - Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse
    a) méthylation,
    b) chromatographie.

B - Etude analytique des lécithines modifiées par l'irradiation.

1 - Extraction lipidique
2 - Séparation des phospholipides.
3 - Détermination du rapport $\frac{AGE}{P}$
4 - Analyse des chaînes acylées par chromatographie en phase gazeuse.
    a) formation des dérivés méthylés,
    b) séparation des composés méthylés,
    c) chromatographie en phase gazeuse.

II - Effet sur les lipides plasmatiques.

1 - Irradiation des échantillons
2 - Dosage du malonaldéhyde
3 - Extraction lipidique
4 - Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

## ACTION DES RAYONS β SUR LE SANG

I - Formation de peroxydes lipidiques.

1 - Incubation
2 - Dosage des peroxydes lipidiques
3 - Calcul du coefficient d'efficacité biologique (G).

II - Facteurs chimiques de la peroxydation lipidique du sang.

1 - Incubation
2 - Dosage des peroxydes lipidiques.

## ÉTUDE METABOLIQUE DES PRODUITS DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE

I - Incorporation in vivo de l'acide (1-$^{14}$C) azélaïque dans les lipides du rat.

1 - Préparation de l'acide (1-$^{14}$C) azélaïque
2 - Protocole expérimental
3 - Extraction lipidique et évaluation de la radioactivité tissulaire
4 - Fractionnement des lipides.

II - Incorporation in vitro de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque dans les lipides sanguins.

1 - Préparation de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque
2 - Conditions d'incubation
3 - Extraction et chromatographie des lipides
4 - Analyses électrophorètiques.
    a) électrophorèse sur acétate de cellulose,
    b) électrophorèse sur disque.
5 - Action de la phospholipase A.

III - Action de l'acide azélaïque sur la consommation d'oxygène d'homogénats hépatiques.

1 - Préparation de l'homogénat
2 - Incubations
3 - Mesures manométriques
4 - Expression des résultats.

## 2ème PARTIE

## T E C H N I Q U E S

### ACTION DES RAYONS X SUR LE SANG

#### I - Effet sur les lipoprotéines plasmatiques lyophilisées.

##### A - Mise en évidence des altérations lipidiques.

###### 1 - Préparation des lipoprotéines.

A partir d'un pool d'échantillons de plasma humain fournis par le Centre de Transfusion sanguine, les lipoprotéines plasmatiques sont fractionnées par précipitation au sulfate de dextrane en milieu calcique suivant la technique de BURSTEIN (216) ; les β-lipoprotéines (β L.P.) sont précipitées et le surnageant contient un mélange d'α-lipoprotéines et de lipoalbumines (α L.P.A.).

Ces deux fractions, précipité et solution, sont dialysées 24 h contre l'eau distillée, puis lyophilisées.

###### 2 - Conditions d'irradiation.

Des parties aliquotes des deux fractions de lipoprotéines sont irradiées par les rayons X dans des capsules en polyéthylène de 60 mm de diamètre.

Dose d'irradiation avec localisateur 20 000 roentgens, débit 1000 R/minute, tension 100 kV, intensité 8 mA, rayonnement filtré par 1,70 mm d'aluminium.

###### 3 - Extraction et fractionnement des lipides.

Les lipoprotéines témoins et les lipoprotéines irradiées sont traitées selon la méthode de FOLCH (217) par le chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v),à raison de 20 fois le poids sec de lipoprotéines à extraire.

Les lipides sont fractionnés par chromatographie en couche mince (plaques neutres 20 cm x 20 cm, 30 g de silicagel G dans 60 ml d'eau distillée, épaisseur 300 μ), à l'aide de systèmes de solvants :

pour les phospholipides : chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (60 : 30 : 6 : 1, v/v/v/v),

pour les lipides neutres : éther de pétrole-éther-acide acétique (80 : 20 : 1, v/v/v).

Les fractions lipidiques sont révélées aux vapeurs d'iode ; dans le cas où elles sont destinées à l'analyse chromatographique en phase gazeuse, nous utilisons la dichlorofluorescéine en solution à 0,2 p. 100 dans un mélange alcool-eau (1 : 1, v/v) et les spots sont grattés le plus rapidement possible pour éviter l'altération des acides gras insaturés (218).

4 - Dosages.

a) Dosage du malonaldéhyde.

Il est effectué par une méthode dérivée de la technique de PLACER et coll. (102), utilisant l'acide thiobarbiturique, sur les lipoprotéines témoins et sur les lipoprotéines irradiées stockées 20 heures à 4°C.

50 mg d'α-L.P.A. et 5 mg de β-L.P. (correspondant à 1 ml de plasma) sont mis en solution dans 1,5 ml de tampon tris pH 7,4 et incubés à 37° pendant 30 minutes. Ensuite 1,5 ml du réactif à l'acide thiobarbiturique (mélange de 2 volumes d'acide thiobarbiturique à 0,8 % et de 1 volume d'acide perchlorique à 7 %) sont ajoutés au milieu et le mélange est chauffé à reflux à 100° pendant 10 minutes. Après refroidissement, 3 ml de n-butanol sont ajoutés ; l'ensemble est agité et centrifugé. La lecture est faite sur le surnageant butanolique à 530 mμ, comparativement à une gamme de malonaldéhyde traitée de manière identique aux essais. Le malonaldéhyde est obtenu après hydrolyse de tétraéthoxypropane par de l'acide chlorhydrique 0,1 N pendant 24 heures à la température du laboratoire (118).

b) Dosage des lipides totaux.

Les lipides totaux sont évalués par pesée.

c) Dosage du phosphore lipidique.

Il est réalisé par la technique de FISKE et SUBBAROW (219). Le phosphore lipidique des lipoprotéines est dosé sur une prise aliquote des extraits après minéralisation en présence d'acide sulfurique et d'eau oxygénée. Les pourcentages des phospholipides séparés sur couche mince sont évalués par le dosage du phosphore lipidique après minéralisation de la poudre de silicagel.

d) Dosage des acides gras estérifiés.

Il est effectué sur les lipides totaux, selon la technique de AYRAULT-JARRIER et POLONOVSKI (220) par la réaction à l'hydroxamate.

Le rapport acides gras estérifiés/phosphore est déterminé après prélèvement des surfaces de silicagel et élution à 5 reprises par 2 ml du mélange chloroforme-méthanol (1 : 1, v/v). Sur des parties aliquotes de cette solution, les dosages du phosphore lipidique et des acides gras estérifiés sont faits selon les méthodes décrites précédemment.

5 - Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

a) Méthylation.

Les acides gras estérifiés (glycérophospholipides, glycérides et stérides) sont hydrolysés et méthylés par traitement de la poudre de silicagel par le méthanol sulfurique à 10% pendant 1 H 30 (221).

L'hydrolyse des sphingomyélines nécessite une durée de 16 h.

La solution contenant les dérivés méthylés, extraits par l'éther de pétrole en présence d'eau, est deshydratée par le sulfate de sodium anhydre.

Les acides gras libres sont méthylés par le diazométhane (action à 0° de la potasse aqueuse à 40 % sur la nitrosométhylurée en solution éthérée).

b) Chromatographie.

Les dérivés méthylés sont chromatographiés dans l'hexane avec un appareil "Aerograph" 204 B, équipé d'une double colonne d'Aeropak 30 imprégnée de tetracyanoéthylate de pentaerythrytol (TCEPE) à 10% et d'un détecteur à ionisation de flamme. Le débit d'azote pour chaque colonne est de 25 ml/min., les températures de l'injecteur et du détecteur sont de 190°, la température des colonnes est programmée de 120 à 160° à raison de 2°/minute.

La détermination des temps de rétention des acides gras analysés est établie par rapport aux temps de rétention de mélanges d'acides gras témoins ; dans certains cas l'étalonnage est complété par l'addition de témoins internes. Les concentrations molaires de chaque acide gras sont calculées par planimétrie et exprimées en pourcentages.

B - Etude analytique des lécithines modifiées par l'irradiation.

1 - Extraction lipidique.

Les lipides de 0,5 g (correspondant à 10 ml de plasma) de poudre lyophilisée d'α-L.P.A. sont extraits par la méthode de FOLCH et coll. (217).

2 - Séparation des phospholipides.

Les phospholipides sont fractionnés par chromatographie en couche mince bidimensionnelle suivant la technique d'ABRAMSON et BLECHER (222) en utilisant des plaques basiques de 300 μ d'épaisseur (30 g silicagel G dans 60 ml de $Na_2CO_3$ 0,01 M). Nous adoptons les mélanges de solvants suivants :

- en première dimension : chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (60 : 30 : 6 : 1, v/v/v/v).
- en deuxième dimension : chloroforme-méthanol-ammoniaque 7 N (65 : 35 : 5, v/v/v).

3 - Détermination du rapport $\frac{AGE}{P}$ .

Après révélation des plaques par les vapeurs d'iode, les surfaces de silicagel sont prélevées, éluées comme il a déjà été décrit et les dosages du phosphore lipidique et des acides gras estérifiés sont effectués par les méthodes signalées antérieurement.

4 - Analyse des chaînes acylées par chromatographie en phase gazeuse.

Cette analyse est appliquée aux taches de phospholipides de Rf 0,20 et aux taches de lécithines (Rf 0,38) séparées par chromatographie bidimensionnelle après révélation par la dichlorofluorescéine à 0,2 p. 100 dans un mélange alcool-eau (1 : 1, v/v).

Nous distinguons trois étapes différentes : la formation des dérivés méthylés, leur séparation et la chromatographie en phase gazeuse.

a) Formation des dérivés méthylés.

La méthanolyse est réalisée sur la poudre de silicagel à l'aide de méthanol sulfurique à 10 p. 100 et les dérivés méthylés sont extraits par l'éther de pétrole en présence d'eau.

b) Séparation des composés méthylés.

La solution éthérée est évaporée, reprise par le mélange chloroforme-méthanol (1 : 1, v/v) et est soumise à la chromatographie en couche mince : (Silicagel G, solvant : benzène Merck) selon la technique de MORRISON et SMITH (223), afin de séparer les esters méthyliques des diméthylacétals.

La préparation du témoin de diméthylacétal nécessite une purification préalable suivant la technique décrite par GRAY (224).

Après séchage des plaques à 110° pendant 1 minute, les dérivés méthylés sont révélés par la dichlorofluorescéine à 0,2 p. 100 dans un mélange alcool-eau (1 : 1, v/v), puis élués par le mélange chloroforme-méthanol-eau (1 : 1 : 1, v/v/v).

La phase supérieure entraînant le colorant est rejetée. La phase inférieure contenant les dérivés méthylés est évaporée et reprise par l'hexane pour être soumise à la chromatographie en phase gazeuse.

c) Chromatographie en phase gazeuse.

Les dérivés méthylés sont déterminés avec un appareil "Aerograph" 204 B équipé d'une colonne de chromosorb imprégnée de diéthylène glycolsuccinate (DEGS) à 10 % et d'un détecteur à ionisation de flamme. La température de la colonne est de 85° pour les composés à chaîne carbonée inférieure à 14 atomes de carbone et de 185° pour les autres composés. Le débit d'azote est de 25 ml/mn. Les concentrations molaires de chaque acide gras sont calculées par planimétrie.

Nous utilisons des témoins d'acides gras de 6 à 20 atomes de carbone et des

témoins d'aldéhydes gras de 6 à 10 atomes de carbone (Fluka).

L'acide nonanal-9-oïque est préparé par nos soins par hydroxylation (225) de l'acide oléique avec l'acide performique suivie d'oxydation periodique selon la méthode de HUBER (226), La méthylation des différents témoins est effectuée par le diazométhane en solution éthérée.

II - Effet des Rayons X sur les lipides plasmatiques.

1 - Irradiation des échantillons.

10 ml de plasma ou 10 ml de sang total sont exposés aux rayons X dans des capsules en polyéthylène de 6 cm de diamètre. Les conditions d'irradiation sont les suivantes : tensions 100 kV, intensité 8 mA, débit 1 000 roentgens/minute, dose croissante de 500 à 20 000 roentgens, présence d'un localisateur. Des dosages témoins correspondant à des échantillons non soumis à l'action des rayons X sont parallèlement effectués.

2 - Dosage du malonaldéhyde.

Il est effectué par l'acide thiobarbiturique sur une prise d'essai de 1 ml de plasma après adjonction de 0,5 ml de tampon tris pH 7,4. Les résultats sont exprimés en micromoles de malonaldéhyde par litre de plasma.

3 - Extraction lipidique.

Elle est réalisée sur le plasma par le chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v).

4 - Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

Cette étude est appliquée essentiellement aux phospholipides plasmatiques qui sont particulièrement radiosensibles. La méthanolyse est réalisée directement sur la poudre de silicagel à l'aide de méthanol sulfurique à 10 p. 100 et les dérivés méthylés sont extraits par l'éther de pétrole en présence d'eau. L'analyse des dérivés méthylés par chromatographie en phase gazeuse s'effectue comme nous l'avons déjà décrit.

## ACTION DES RAYONS β SUR LE SANG

### I - Formation de peroxydes lipidiques.

#### 1 - Incubation.

10 ml de sang total sont additionnés de $^{32}P$ (sous forme de phosphate disodique ou de $^{131}I$ (sous forme d'iodure) ou de $^{198}Au$ (sous forme d'or colloïdal) et agités à 37°.

Deux groupes d'expériences sont conduits ; les unes en présence de 200 µC d'élément radioactif pendant un temps variable (de 30' à 24 heures), les autres pendant 6 heures avec des radioactivités croissantes (de 10 à 2 000 µC).

Des dosages témoins sont effectués après incubation du plasma additionné d'isotopes radioactifs ou après incubation du sang total seul.

#### 2 - Dosage des peroxydes lipidiques.

Les peroxydes lipidiques sont évalués par le dosage du malonaldéhyde au thiobarbiturate (102) sur 1 ml de plasma additionné de 0,5 ml de tampon tris pH 7,4. Les résultats sont exprimés en µmole de malonaldéhyde par litre de plasma.

#### 3 - Calcul du coefficient d'efficacité biologique (G).

Les valeurs de G (nombre de molécules de malonaldéhyde produites pour 100 eV d'énergie absorbée) sont calculées après conversion des microcuries du rayonnement en rads absorbés. Dans ce calcul, on ne compare que l'énergie délivrée par les rayons β de ces éléments.

Les unités standards pour la conversion sont les suivantes :

1 rad = $6,25.10^{13}$ eV/g

1 mole/g = $6,0 .10^{23}$ molécules.

### II - Facteurs chimiques de la peroxydation lipidique du sang.

#### 1 - Incubation

Des échantillons de 10 ml de sang sont incubés sous agitation lente pendant 4 heures à 37° en présence de 200 µC de $^{32}P$ (sous forme de phosphate disodique) et d'effecteurs en solution isotonique tels que l'hydroquinone (2 à 10 µM), la sérumalbumine humaine (20 à 200 mg), le sulfate ferreux (10 à 100 µM), l'éthylène diamine tétraacétate de sodium (EDTA) (1 à 10 µM).

Des dosages témoins sont effectués en présence de l'élément radioactif sans effecteur.

2 - Dosage des peroxydes lipidiques.

Les peroxydes sont évalués par le dosage du malonaldéhyde au thiobarbiturate (102) sur 1 ml de plasma additionné de 0,5 ml de tampon tris pH 7,4.

ETUDE METABOLIQUE DES PRODUITS DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE

I - Incorporation in vivo de l'acide (1-$^{14}$C) azélaïque dans les lipides du rat.

1 - Préparation de l'acide (-$^{14}$C) azélaïque.

L'acide (1-$^{14}$C) oléique (activité spécifique : 44 µCi/µM) dilué au 1/1000e avec de l'acide oléique non marqué est hydroxylé par l'acide performique en acide 9, 10-dihydroxystéarique. Celui-ci est oxydé par l'acide periodique en aldéhyde nonanoïque ou aldéhyde pélargonique et en acide nonanal-9-oïque marqué sur le carboxyle 1, ce dernier étant en partie oxydé en son diacide, l'acide (1-$^{14}$C) azélaïque. Après extraction par l'éther, la phase aqueuse est neutralisée par de la soude, évaporée à sec et reprise par de l'éther afin d'éliminer le sulfate de sodium formé.

2 - Protocole expérimental.

0,15 µCi d'acide (1-$^{14}$C) azélaïque obtenu (radioactivité spécifique : 44 µCi/mM) est administré en solution aqueuse par intubation stomacale à des rats blancs de race albinos, de souche Wistar, de poids compris entre 200 et 300 g, âgés de 6 semaines environ et mis à jeun depuis 24 heures.

8 heures après, les rats sont sacrifiés ; le foie, les poumons, les reins et l'épididyme sont prélevés ; l'urine et les fèces sont recueillies et le sang ponctionné est recueilli sur anticoagulant (anticlot).

3 - Extraction lipidique et évaluation de la radioactivité tissulaire.

Les lipides tissulaires et plasmatiques sont extraits par le chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v) à raison de 50 fois le poids de tissu frais et de 20 fois le volume plasmatique. Les lipides globulaires sont obtenus par la méthode de ROSE et OKLANDER (227) à partir de 1 volume d'hématies additionné de 1 volume d'eau et de 11 volumes d'isopropanol. Après 60' d'agitation, 7 volumes de chloroforme sont ajoutés. La solution est agitée 60' et évaporée.

Les extraits lipidiques sont repris par 2 ml de chloroforme-méthanol (1 : 1, v v).

La radioactivité des extraits lipidiques est déterminée sur une prise aliquote avec un spectromètre Tricarb (Packard), en utilisant pour chaque comptage 10 ml du mélange scintillant (1 volume d'eau pour 5 volumes de dioxane contenant 10 % naphtalène, 0,03 % diméthyl-1, 4-bis 2 (4-méthyl-5-phényl-oxazolyl) benzène et 0,7 % diphényl-oxazole.

La radioactivité de l'urine est évaluée directement sur une prise aliquote n'excédant pas 0,1 ml.

La radioactivité des fèces est estimée après extraction plusieurs fois à l'éther et elle est effectuée sur une prise aliquote.

4 - Fractionnement des lipides.

Les phospholipides sont fractionnés par chromatographie en couche mince (silicagel G, solvant : $CHCl_3$-$CH_3OH$-$H_2O$-$CH_3COOH$ (60 : 30 : 6 : 1, v/v/v/v) suivie d'autoradiographie (papier Kodirex, temps d'exposition : une à deux semaines).

Les lipides neutres sont séparés par chromatographie en couche mince (silicagel G, solvant : éther de pétrole-éther-$CH_3COOH$ (80 : 20 : 1, v/v/v) suivie d'auradiographie.

La séparation des composés urinaires est réalisée, à partir d'urine, dans le solvant des diacides : éthanol-$NH_4OH$ à 24 % - $H_2O$ (100 : 12 : 16, v/v/v) sans saturation de la cuve et est suivie d'autoradiographie.

La chromatographie des dérivés méthylés urinaires et globulaires est effectuée dans le benzène Merck et suivie d'autoradiographie.

II - Incorporation in vitro de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque dans les lipides sanguins.

1 - Préparation de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque.

Elle s'effectue à partir d'acide (1-$^{14}$C) oléique (activité spécifique : 44 mCi/mM). Celui-ci provient du Centre d'Energie Atomique de Saclay et est livré en solution dans l'hexane.

L'acide (1-$^{14}$C) oléique est dilué au 1/100e avec de l'acide oléique non marqué ; l'ensemble est mélangé, repris par de l'hexane puis évaporé.

L'acide oléique subit l'oxydation performique selon la technique décrite par SWERN et coll. (225), suivie de l'oxydation periodique du dihydroxyacide formé (226). Au lieu d'acide periodique, nous utilisons du periodate de sodium dans de l'acide sulfurique N. L'acide nonanal-9-oïque est ensuite isolé des produits de la réaction, après extraction par l'éther, par chromatographie en couche mince de la phase éthérée dans le solvant basique : chloroforme-méthanol-ammoniaque 7 N (76 : 30 : 5, v/v/v); il est gratté et élué par de l'éther distillé. Sa radioactivité est déterminée sur une prise aliquote avec un spectromètre "Packard Tricarb" en utilisant 10 ml du mélange scintillant (1 volume d'eau pour 5 volumes de dioxane contenant 10 % naphtalène ; 0,03 % diméthyl-1, 4-bis 2 (4-méthyl-5-phényl-oxazolyl) benzène et 0,7 % diphényloxazole.

2 - Conditions d'incubation.

Les diverses expériences sont effectuées sur des échantillons de sang humain (sang total, hématies ou plasma). 1 ml de sang total, (ou 0,5 ml de globules rouges lavés trois fois au sérum physiologique, ou 0,5 ml de plasma) additionné de 0,5 ml de chlorure de sodium à 9 ‰, est mis à incuber en présence des acides gras marqués au $^{14}$C (100.000 cpm) (activités spécifiques: acide oléique 44 $\mu$Ci/$\mu$M, et acide nonanal-9-oïque 44 $\mu$Ci/100 $\mu$M) et de 10 $\mu$M ATP, 0,5 $\mu$M CoA, 250 $\mu$M de tampon phosphate pH 7,0 et 6 $\mu$M de $MgCl_2$.

Dans certaines expériences, l'ATP, le CoA ou les deux cofacteurs sont omis.

Le volume final est de 3 ml et la concentration osmolaire de 771 µosmoles par millilitre.

Après une heure d'agitation à 37°, le sang est centrifugé, le surnageant plasmatique prélevé et les globules rouges lavés 3 fois au sérum physiologique.

Par ailleurs une cinétique d'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque est effectuée sur le sang total.

Des incubations de plasma et de sang total portés a ébullition pendant 1 heure sont parallèlement effectuées.

### 3 - Extraction et chromatographie des lipides.

Les lipides plasmatiques sont extraits par la méthode de FOLCH et coll. (217) à l'aide de chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v) à raison de 20 fois le volume de plasma à extraire. Les globules sont traités selon la méthode de ROSE et OKLANDER (227) par l'isopropanol et le chloroforme.

Lors de l'étude de la cinétique et de l'influence de l'ébullition portant sur le sang total, les lipides en sont extraits par l'isopropanol-chloroforme afin d'obtenir des extraits exempts d'hémoglobine ou de ses dérivés d'oxydation.

Les extraits lipidiques sont repris par 2 ml de chloroforme-méthanol (1 : 1, v/v) ; une prise aliquote est comptée par scintillation liquide afin de déterminer la teneur en acides nonanal-9-oïque et oléique de la phase organosoluble.

Les lipides sont fractionnés par chromatographie en couche mince (plaques neutres 20 cm x 20 cm, 30 g de silicagel G dans 60 ml d'eau distillée, épaisseur 500 µ) à l'aide des systèmes de solvants suivants :

- Pour l'acide oléique : chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (60 : 30 : 6 : 1, v/v/v/v).
- Pour l'acide nonanal-9-oïque : chloroforme-méthanol-ammoniaque 7 N (76 : 30 : 5, v/v/v).

Les chromatographies sont suivies d'autoradiographie (papier Kodirex, temps d'exposition : une à deux semaines).

Dans certains cas, des chromatographies bidimensionnelles sont réalisées :

- solvant 1 : chloroforme-méthanol-$NH_4OH$ 7 N (76 : 30 : 5 , v/v/v).
- solvant 2 : chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (60 : 30 : 6 : 1, v/v/v/v).

Parfois ce solvant est remplacé par le solvant neutre :

- chloroforme-méthanol-eau (65 : 25 : 4, v/v/v).

La radioactivité de chaque fraction lipidique marquée est mesurée par comptage en scintillation liquide.

L'action de la p-nitrophénylhydrazine est effectuée sur les phospholipides à acide nonanal-9-oïque. Une solution de p-nitrophénylhydrazine à 0,02 % (pds/vol.) dans le méthanol est ajoutée au composé en solution méthanolique. Le mélange est laissé à la température du laboratoire pendant une nuit, puis évaporé à sec. Le résidu est chromatographié sur couche mince dans le solvant basique déjà signalé.

4 - Analyses électrophorètiques.

Des électrophorèses du plasma sont effectuées après incubation de sang total avec les acides nonanal-9-oïque et oléique, d'une part sur acétate de cellulose, d'autre part sur gel de polyacrylamide.

a) Les électrophorèses sur acétate de dellulose sont conduites selon les données classiques, dans une microcuve Jouan, avec des bandes Sepraphore III en tampon véronal, véronal sodique pH 8,6 (tampon de DURRUM) pendant 1 H 15 sous une tension de 180 volts et une intensité de 1,5 mA par bande. Après séchage à l'air des bandes électrophorètiques, des autoradiographies sont immédiatement réalisées (papier Kodirex , temps d'exposition : minimum 2 semaines). Les portions de bandes radioactives sont découpées et comptées dans des flacons à scintillation. La solubilisation de l'acétate de cellulose par le liquide à scintillation est quasi immédiate. Les bandes sont révélées, seulement après l'autoradiographie à l'aide d'une solution d'amidoschwartz à 0,5 % (pds/vol.), dans du méthanol acétique.

Les portions de bandes contenant les sérum albumines sont découpées. Elles sont ensuite traitées pendant 1 heure par le mélange chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v). L'extrait lipidique est évaporé à sec puis repris par l'éthanol à 95°, afin d'éliminer le maximum d'acétate de cellulose.

b) Afin d'avoir une séparation plus fine des fractions protéiques et lipoprotéiques, nous avons par ailleurs utilisé la technique d'électrophorèse sur disque. Des électrophorèses de plasma sur gels de polyacrylamide sont conduites avec l'appareil de SHANDON selon la méthode de DAVIS (228) sur des cylindres en verre de 70 x 6,5 mm contenant de l'acrylamide à 7 %, polymérisé photochimiquement. Les gels sont mis à migrer à pH 8,6 dans le tampon tris-glycocolle auquel on ajoute 1 ml d'une solution de bleu de bromophénol à 0,005 %, afin de suivre la migration et de colorer une fraction des albumines. La durée de migration est d'environ 1 H 30 sous une tension croissante de 25 volts à 120 volts. Une colonne témoin seulement est colorée à l'aide d'une solution d'amidoschwartz à 0,5 % dans de l'eau acétique à 7 % pendant 1 heure. Les autres colonnes sont découpées en disques et les fractions de gel sont désagrégées par passage dans une seringue hypodermique avant d'être comptées.

5 - Identification de la liaison de l'acide nonanal-9-oïque sur le glycérol des phospholipides.

Afin de déterminer la position de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque dans les phospholipides, nous avons utilisé la phospholipase A de Crotalus terr. terr. (Calbiochem) qui libère classiquement l'acide gras fixé sur le carbone 2 du phospholipide.

Le phospholipide radioactif obtenu par élution des fractions de silicagel prélevées après chromatographie et autoradiographie, est émulsionné par ultrasonation de 3' dans 2 ml de tampon tris-maléate (pH 7,0) contenant 1 ml de $Cl_2Ca$ 0,02 M et 4 mg de désoxycholate de sodium. 100 $\gamma$ de phospholipase A et 10 ml d'éther sont alors ajoutés au milieu d'incubation. Après 3 heures d'incubation à la température du laboratoire

sous agitation, les produits de la réaction sont extraits par 25 ml de chloroforme-méthanol (2 : 1, v/v), évaporés à sec, repris par 0,2 ml de chloroforme-méthanol (1 : 1, v/v) et chromatographiés sur couche mince de silicagel G (solvant basique signalé antérieurement). Après autoradiographie, la radioactivité des composés est mesurée au compteur à scintillation.

L'action phospholipasique est complétée par les hydrolyses chimiques (228 bis).

III - Action de l'acide azélaïque sur la consommation d'oxygène d'homogénats hépatiques.

Les mesures de consommation d'oxygène sont faites à l'aide du respiromètre différentiel GILSON à pression constante selon la technique manométrique de WARBURG à 38° en milieu aérobie sur un homogénat de foie de rat en présence d'effecteurs et de l'acide à étudier.

1 - Préparation de l'homogénat.

Nous avons utilisé des rats Wistar d'un poids moyen de 200 g, soumis à la diète hydrique depuis au moins 5 heures.

Les rats sont sacrifiés par rupture des vertèbres cervicales. Le foie est prélevé rapidement et lavé dans du sérum physiologique refroidi afin d'éliminer le sang. Sur une quantité aliquote du foie (5 g) découpé en fins petits morceaux, l'homogénéisation est réalisée à l'aide de l'appareil de POTTER-ELVEHJEM à 0° en présence de 5 ml de saccharose 0,25 M/KCl 0,2 M contenant 60 mg d'EDTA dans 200 ml de solution.

2 - Incubations.

Chaque série d'expériences est effectuée avec un homogénat provenant d'un seul rat.

Les fioles contiennent,dans le compartiment central,l'homogénat hépatique, correspondant à 500 mg de foie, dans un volume final de 3,2 ml. En plus des acides à étudier (30 µM d'acide pélargonique ou 30 µM d'acide azélaïque) en solution dans le tampon phosphate, le mélange d'incubation contient 150 µM de tampon phosphate pH 7,4, 23 µM de $MgCl_2$ et 16 µM d'ATP, ce dernier cofacteur étant dissout dans le tampon.

Le diverticule latéral contient 90 µM de glucose et 20 unités d'hexokinase de levure de bière (Fluka) en solution dans le tampon phosphate pH 7,4.

Dans le puits central,est introduit 0,3 ml de potasse à 20 %. On augmente la surface de contact entre l'atmosphère et la potasse par l'adjonction d'un fragment de papier filtre.

Le tableau I reproduit le protocole expérimental utilisé.

| Mélange d'incubation | Témoin | Essai avec acide azélaïque | Essai avec acide pélargonique |
|---|---|---|---|
| Homogénat 5 g/5ml | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 | 2,5 | 1,5 | 1,5 |
| ATP 0,16 M | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| $MgCl_2$ 0,23 M | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| *Acide pélargonique 30 mM | - | - | 1 |
| *Acide azélaïque 30 mM | - | 1 | - |
| Glucose 300 mM | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Hexokinase 100 unités/ml | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| KOH à 20 % | 0,3 | 0,3 | 0,3 |

TABLEAU I - Composition du mélange d'incubation. (Valeurs exprimées en ml).

* Les acides azélaïque et pélargonique (3mM) sont dissous dans 0,5 ml d'éthanol à 95° additionné de tampon phosphate pH 7,4 qsp 100 ml. Ces solutions sont ultrasonées 5'.

Le pH final est contrôlé pour chaque essai.

Les mesures de tension superficielle sont effectuées par la méthode d'arrachement à l'aide du tensiomètre de LECOMTE DU NOUY.

3 - Mesures manométriques.

A la fin d'une période de préincubation de 10', le contenu du diverticule latéral des fioles est ajouté au compartiment central. La consommation d'oxygène est suivie de 5' en 5' jusqu'à une durée minimale de 1 heure ; les lectures sont faites sur les manomètres directement en volumes (exprimée en $\mu$l).

4 - Expression des résultats.

Les courbes d'oxygène consommé (en micromoles) sont tracées en fonction du temps. A partir de ces résultats, nous avons calculé les écarts-types.

Le $Q_{O_2}$ est défini par la formule :

$$Q_{O_2} = \frac{\mu l \ O_2 \text{ consommé}}{\text{mg de protéines} \times t}$$

t = durée de la mesure exprimée en heures.

Les protéines sont estimées par la méthode de LOWRY (229).

# 3ème PARTIE

# R E S U L T A T S  E T  D I S C U S S I O N

## CHAPITRE I

## ACTION DES RAYONS X SUR LE SANG

### 1 - Effet sur les lipoprotéines plasmatiques lyophilisées.

A - Mise en évidence des altérations lipidiques.

RESULTATS.

1 - Formation des peroxydes lipidiques.

2 - Analyse sommaire des lipides des lipoprotéines normales et des lipoprotéines irradiées.

3 - Analyse des phospholipides.

a) Pourcentages des principaux phospholipides

b) Détermination du rapport acides gras estérifiés/Phosphore $(\frac{AGE}{P})$ des lécithines et des phospholipides de Rf 0,20.

4 - Analyse chromatographique des acides gras.

DISCUSSION

B - Etude analytique des lécithines modifiées par l'irradiation.

RESULTATS

1 - Séparation des phospholipides

2 - Rapport acides gras estérifiés/Phosphore des phospholipides de Rf 0,20.

3 - Analyse des chaînes acylées par chromatographie en phase gazeuse.

DISCUSSION

II - Effet des Rayons X sur les lipides plasmatiques.

RESULTATS

1 - Formation de peroxydes lipidiques.

2 - Chromatographie en phase gazeuse des acides gras.

DISCUSSION

III - Comparaison de la peroxydation lipidique dans les α-lipoprotéines et dans le plasma.

# CHAPITRE I

## ACTION DES RAYONS X SUR LE SANG

Nous déterminerons l'effet de ces radiations tout d'abord sur les lipoprotéines plasmatiques, ensuite sur le sang total.

### I - Effet sur les lipoprotéines plasmatiques lyophilisées.

A - Mise en évidence des altérations lipidiques.

RESULTATS.

1 - Formation de peroxydes lipidiques.

Le dosage du malonaldéhyde est effectué sur les lipoprotéines après 20 heures de stockage à 4°C.

Dans les α-L.P.A., le taux de malonaldéhyde rapporté à 100 ml de plasma passe de 0,08 µM à 0,185 µM après action des rayons X (20 000 R).

Dans les β-L.P. non irradiées il est de 0,094 µM ; dans les mêmes conditions d'irradiation il monte à 0,125 µM.

Nous n'avons remarqué aucune formation de malonaldéhyde consécutive à un stockage plus prolongé à 4°C.

2 - Analyse sommaire des lipides des lipoprotéines normales et des lipoprotéines irradiées.

Le tableau II rapporte les valeurs des lipides totaux, du phosphore lipidique total et des liaisons esters dans les lipoprotéines (valeurs correspondantes à 100 ml de plasma.

| | Lipides totaux mg | Phosphore lipidique total mg | Esters µEq |
|---|---|---|---|
| α-L.P.A. normales | 226,4 | 2,40 | 310 |
| α-L.P.A. irradiées | 200 | 2,39 | 297 |
| β-L.P. normales | 560 | 4,52 | 574 |
| β-L.P. irradiées | 568,8 | 4,33 | 560 |

TABLEAU II - Teneurs en phosphore lipidique et en liaisons esters des lipoprotéines normales et des lipoprotéines irradiées.

Ces résultats montrent que le phosphore lipidique total et les liaisons esters des lipoprotéines irradiées ne subissent pas de grande modification. C'est pourquoi l'étude des variations des phospholipides est entreprise.

3 - Analyse des phospholipides.

a) Pourcentages des principaux phospholipides.

La séparation des phospholipides en couche mince fait apparaître, après irradiation des lipoprotéines, une augmentation de la fraction de Rf 0,20 (PL 0,20) classiquement identifiée aux lysolécithines. Les proportions de ce phospholipide s'élèvent de 19,4 à 29,5 % pour les α-L.P.A., de 8,1 % à 10,7 % pour les β-L.P. (Tableau IV).

| | Céphalines | Lécithines | Sphingomyélines | PL 0,20 |
|---|---|---|---|---|
| α-L.P.A. normales | 4,3 | 63 | 13,3 | 19,4 |
| α-L.P.A. irradiées | 4,7 | 54 | 11,8 | 29,5 |
| β-L.P. normales | 4,2 | 57,7 | 30 | 8,1 |
| β-L.P. irradiées | 3,8 | 54 | 31,5 | 10,7 |

TABLEAU III - Pourcentages des principaux phospholipides extraits de lipoprotéines avant et après irradiation (Valeurs exprimées par rapport aux phospholipides totaux).

b) Détermination du rapport liaisons esters/phosphore ($\frac{AGE}{P}$) des lécithines et des phospholipides de Rf 0,20

Dans les échantillons non irradiés, les rapports ($\frac{AGE}{P}$) des taches de lécithines (Rf 0,38) et de lysolécithines (Rf 0,20) sont respectivement de :

- 2,0 et 1,1 pour les α-L.P.A. (tableau IV),
- 2,1 et 1,0 pour les β-L.P. (tableau V).

Dans les échantillons irradiés, ces rapports sont identiques aux précédents pour les lécithines, mais en diffèrent pour la fraction de Rf 0,20 dite lysolécithinique, dont le rapport $\frac{AGE}{P}$ devient 1,5 dans les α-L.P.A. (tableau IV) et 1,2 dans les β-L.P. (tableau V).

| | | Phosphore µM | Acides gras estérifiées µEq | AGE/P Valeurs trouvées | AGE/P Valeurs théoriques |
|---|---|---|---|---|---|
| α-L.P.A. normales | Lécithines | 2,4 | 4,9 | 2,0 | 2,0 |
| | Lysolécithines | 0,7 | 0,8 | 1,1 | 1,0 |
| α-L.P.A. irradiées | Lécithines | 2 | 4,1 | 2,0 | 2,0 |
| | Phospholipides Rf 0,20 | 1,1 | 1,7 | 1,5 | - |

TABLEAU IV - Influence des radiations ionisantes sur le rapport $\frac{AGE}{P}$ des lécithines et de leurs dérivés dans les α-L.P.A. plasmatiques.

Prise d'essai : 5 ml de plasma.

| | | Phosphore µM | Acides gras estérifiés µEq | AGE/P Valeurs trouvées | AGE/P Valeurs théoriques |
|---|---|---|---|---|---|
| β-L.P. normales | Lécithines | 3,0 | 6,3 | 2,1 | 2,0 |
| | Lysolécithines | 0,4 | 0,4 | 1,0 | 1,0 |
| β-l.P. irradiées | Lécithines | 2,9 | 6,2 | 2,1 | 2,0 |
| | Phospholipides Rf 0,20 | 0,5 | 0,6 | 1,2 | - |

TABLEAU V - Influence des radiations ionisantes sur le rapport $\frac{AGE}{P}$ des lécithines et de leurs dérivés dans les β-L.P. plasmatiques.

Prise d'essai : 5 ml de plasma.

Ces résultats suggèrent que les taches de Rf 0,20 dont les rapports $\frac{AGE}{P}$ sont égaux à 1,5 ou à 1,2 suivant les lipoprotéines sont un mélange de lysodérivés et de lécithines altérées.

La chromatographie en phase gazeuse des phospholipides, en particulier des phospholipides de Rf 0,20 nous permet de confirmer cette hypothèse.

4 - Analyse chromatographique des acides gras.

La chromatographie en phase gazeuse des acides gras après leur méthylation est effectuée sur les principaux lipides neutres (acides gras libres, triglycérides et stérides) et sur les principaux phospholipides (céphalines, lécithines et lysolécithines).

Les tableaux VI, VII et VIII rapportent la composition en acides gras des trois groupes de lipides neutres : acides gras libres, triglycérides et stérides.

Le tableau VI représentatif de la composition des acides gras libre montre que seules les α-L.P.A. sont modifiées : le taux des acides gras insaturés passe de 64,7 % à 46,0 %.

| Acides | α-L.P.A. normales | α-L.P.A. irradiées | β-L.P. normales | β-L.P. irradiées |
|---|---|---|---|---|
| 14 : 0 | traces | 6,1 | traces | traces |
| non id. | traces | 6,4 | traces | traces |
| 16 : 0 | 22,5 | 25,4 | 10,9 | 11,3 |
| 16 : 1 | 14 | 16,4 | 23,9 | 22,5 |
| 18 : 0 | 12,7 | 14,2 | 3,7 | 5,3 |
| 18 : 1 | 31,3 | 16 | 31,5 | 31,4 |
| 18 : 2 | 7,3 | 9,1 | 5 | 4,3 |
| 18 : 3 | traces | traces | | |
| 20 : 0 | traces | traces | | |
| 20 : 4 | 12,1 | 4,5 | 24,9 | 25,1 |
| Saturés | 35,2 | 52,1 | 14,6 | 16,6 |
| Insaturés | 64,7 | 46,0 | 85,3 | 83,3 |

TABLEAU VI - Composition en acides gras libres des lipoprotéines avant et après irradiation

La présence d'acide arachidonique en aussi forte proportion est confirmée par l'adjonction au mélange à analyser d'un étalon interne et l'observation d'un pic unique d'acide arachidonique.

Le tableau VII rapporte la composition en acides gras des triglycérides des lipoprotéines plasmatiques avant et après l'irradiation par les rayons X.

| Acides | α-L.P.A.normales | α-L.P.A.irradiées | β-L.P.normales | β-L.P.irradiées |
|---|---|---|---|---|
| 12 : 0 | 1 | 1,6 | 0,4 | 0,5 |
| non id. | 0 | 4,3 | 2,1 | 0 |
| 14 : 0 | 1,5 | 9,5 | 1,3 | 2,1 |
| non id. | 0 | 9,1 | 2,8 | 0 |
| 16 : 0 | 23,4 | 8,3 | 18,2 | 17,8 |
| 16 : 1 | 5,8 | 17 | 7,6 | 3,7 |
| non id. | 0 | 9,1 | 0 | 0 |
| 18 : 0 | 16,4 | 1,8 | 13 | 2,6 |
| 18 : 1 | 36 | 24,4 | 44 | 55 |
| 18 : 2 | 7,3 | 6,2 | 8,4 | 15,7 |
| 20 : 0 | 4,1 | 1,8 | traces | 3,8 |
| 20 : 4 | 4,7 | 7,3 | 1,8 | 1,7 |
| Saturés * | 46,3 | 45,5 | 37,8 | 26,8 |
| Insaturés | 53,7 | 54,5 | 62,2 | 71,2 |

TABLEAU VII - Composition en acides gras des triglycérides des lipoprotéines avant et après irradiation.

Seuls les acides gras des triglycérides appartenant aux α-L.P.A. ont subi une modification : augmentation des acides de longueur de chaîne inférieure à celle de l'acide palmitique. De plus, nous avons observé dans les deux lots de lipoprotéines une baisse du stéarate de méthyle.

* Le taux en acides gras saturés est calculé en supposant que les acides gras non identifiés correspondent à des acides saturés.

La chromatographie en phase gazeuse des acides gras des stérides montre des modifications uniquement dans les α-lipoprotéines, en particulier une diminution des acides insaturés, qui passent de 68 % à l'état normal à 59,8 % à l'état irradié (tableau VIII).

| Acides gras | α-L.P.A. normales | α-L.P.A. irradiées | β-L.P. normales | β-L.P. irradiées |
|---|---|---|---|---|
| 16 : 0 | 9,6 | 9,7 | 14,1 | 14,3 |
| 16 : 1 | 13,6 | 11,6 | 4,4 | 2,8 |
| non id. | 13 | 7,5 | 0 | 0 |
| 18 : 0 | 6,1 | 9,2 | 0,8 | 1,2 |
| 18 : 1 | 31 | 23 | 34 | 40,5 |
| 18 : 2 | 21 | 25 | 38 | 36 |
| non id. | 3,3 | 13,8 | 0 | 0 |
| 18 : 3 | 0 | 0 | 7,6 | 5,8 |
| 20 : 4 | 2,7 | 0 | 1,8 | 0 |
| Saturés | 32,0 | 40,2 | 14,9 | 15,5 |
| Insaturés | 68,0 | 59,8 | 85,1 | 84,5 |

TABLEAU VIII- Composition en acides gras des stérides des lipoprotéines avant et après irradiation.

Dans les tableaux IX et XI est rapportée la composition en acides gras des trois principaux groupes de phospholipides : céphalines, lécithines, lysolécithines.

Le solvant des phospholipides utilisé (chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (60 : 30 : 6 : 1, v/v/v/v) ne nous permet pas de séparer de manière satisfaisante les phosphatidyléthanolamines des phosphatidylsérines.

Le tableau IX représente les pourcentages des acides gras des céphalines des lipoprotéines normales et des lipoprotéines irradiées.

| Acides-gras | α-L.P.A. normales | α-L.P.A. irradiées | β-L.P. normales | β-L.P. irradiées |
|---|---|---|---|---|
| 14 : 0 | 7,1 | 8,1 | 7,3 | 10,2 |
| 16 : 0 | 28,3 | 30,4 | 30,5 | 28,4 |
| 16 : 1 | 6,0 | 5,1 | 8,4 | 7,2 |
| 18 : 0 | 14,1 | 15,6 | 11,1 | 12,3 |
| 18 : 1 | 13,3 | 16,4 | 14,6 | 15,1 |
| 18 : 2 | 6,2 | 5,8 | 9,9 | 10,2 |
| 20 : 0 | 5,8 | 5,3 | 6,1 | 7,8 |
| 20 : 4 | 19,2 | 11,8 | 12,1 | 8,7 |
| Saturés | 55,3 | 59,4 | 55,0 | 58,7 |
| Insaturés | 44,7 | 39,1 | 45,0 | 41,2 |

TABLEAU IX - Composition en acides gras des céphalines des lipoprotéines avant et après irradiation.

Nous notons une diminution de l'acide arachidonique dans les deux sortes de lipoprotéines sous l'effet de l'irradiation.

Dans le tableau X sont mentionnés les résultats concernant les lécithines (Rf 0,38).

| Acides gras | α-L.P.A. normales | α-L.P.A. irradiées | β-L.P. normales | β-L.P. irradiées |
|---|---|---|---|---|
| 16 : 0 | 29,5 | 30 | 29,5 | 31 |
| 18 : 0 | 14,1 | 18,2 | 17,2 | 16 |
| 18 : 1 | 20,5 | 20,7 | 23,5 | 26 |
| 18 : 2 | 20,2 | 20,6 | 24,2 | 21,5 |
| 18 : 3 | traces | traces | traces | 4,2 |
| 20 : 0 | 4,6 | traces | traces | traces |
| 20 : 4 | 11,1 | 10 | 1,0 | 1,7 |
| Saturés | 48,2 | 48,2 | 46,7 | 47 |
| Insaturés | 51,8 | 51,3 | 53,1 | 53,4 |

TABLEAU X - Composition en acides gras des lécithines des lipoprotéines avant et après irradiation.

Les lécithines de Rf inchangé (0,38) ne sont pas dans l'ensemble modifiées par l'action des rayons X.

Après irradiation des lipoprotéines les acides gras des phospholipides de Rf 0,20 subissent des variations importantes (Tableau XI).

Dans les α-L.P.A. irradiées nous remarquons une diminution de l'acide palmitique accompagnée d'une augmentation de l'acide palmitoléique, suggérant un phénomène oxydatif par création d'une double liaison.

De plus, les proportions d'acide arachidonique et d'acide linoléique des α-L.P.A. s'abaissent respectivement de 12,4 à 1,1 % et de 13,3 à 7,5 %. Dans les β-L.P. ces modifications sont moins accusées.

| Acides gras | α-L.P.A. normales | α-L.P.A. irradiées | β-L.P. normales | β-L.P. irradiées |
|---|---|---|---|---|
| non id. | 0 | 7,8 | 0 | 4,6 |
| 12 : 0 | 4,1 | 5,6 | 0 | 4,6 |
| 14 : 0 | 0,4 | 4,5 | traces | 8,9 |
| non id. | traces | 5,2 | 0 | 0 |
| 16 : 0 | 43,1 | 35,7 | 34,0 | 25,7 |
| 16 : 1 | 0,5 | 7,1 | traces | 17,3 |
| non id. | 0 | 0 | 0 | 6,9 |
| 18 : 0 | 14,7 | 14,6 | 32,5 | 14,1 |
| 18 : 1 | 11,5 | 11,0 | 18,8 | 10,6 |
| 18 : 2 | 13,3 | 7,5 | 4,9 | 3,2 |
| 20 : 4 | 12,4 | 1,1 | 9,7 | 4,1 |
| Saturés * | 62,3 | 73,4 | 66,5 | 64,8 |
| Insaturés | 37,7 | 26,7 | 33,4 | 35,2 |

TABLEAU XI - Composition en acides gras des phospholipides de Rf 0,20 des lipoprotéines avant et après irradiation.

DISCUSSION.

Cette discussion porte essentiellement sur :

a) la nature lipidique des lipoprotéines normales ,

b) la formation de phospholipides plus polaires au cours de la peroxydation,

c) la diminution de certains acides gras saturés sous l'effet de l'irradiation.

* Les acides gras non identifiés sont supposés être saturés.

a) Comparé aux pourcentages des phospholipides donnés par SKIPSKI et coll. (230), le taux des lysolécithines dans les lipoprotéines normales est beaucoup plus élevé. Cette différence peut être due, semble-t-il, au mode de préparation des lipoprotéines plasmatiques que nous avons utilisé. Le surnageant contient, outre les α-lipoprotéines, les lipoalbumines qui sont très riches en lysophosphatidylcholines et en acides gras libres qu'elles transportent.

Toutes les analyses effectuées sur les lipoprotéines plasmatiques montrent que celles-ci contiennent des acides gras libres. Cette présence d'acides gras libres dans les β-lipoprotéines peut paraître anormale. Cependant SKIPSKI et coll. (230) notent que seulement 55 % des acides gras libres du sérum sont complexés aux albumines, alors que le reste est réparti entre les α et les β-lipoprotéines.

La présence d'acide arachidonique en aussi grande quantité dans les acides gras libres des lipoprotéines nous paraît surprenante. GOODMAN et SHIRATORI (231) signalent dans les acides gras libres du plasma 1,5 % seulement d'acide arachidonique.

Des expériences comparatives sur le plasma liquide et sur le plasma à l'état sec nous ont montré dans ce dernier une augmentation des acides gras libres et des lysolécithines ; ces résultats nous suggèrent la possibilité d'une hydrolyse partielle au cours de la lyophilisation.

NICHOLS et REHNBORG (232) soulignent des variations dans le pourcentage des acides gras selon le mode de dialyse des lipoprotéines. La dialyse contre des ions cuivriques entraîne des diminutions significatives des acides gras polyinsaturés dont les produits d'altération sont retenus sur colonne de diéthylène-glycol-succinate.

Nous nous sommes demandée si la phase stationnaire utilisée (tetracyanoéthylate de pentaerythrytol) ne fait pas apparaître les lipoperoxydes aux lieu et place de l'acide arachidonique.

Afin d'élucider ce problème, nous dialysons les lipoprotéines plasmatiques contre de l'eau déminéralisée et étudions les acides gras libres des lipoprotéines. Dans ces conditions la proportion d'acide arachidonique demeure identique.

Il semble donc que ce composé puisse être identifié à l'acide arachidonique.

b) Dans le cas de l'irradiation des lipoprotéines, nos résultats montrent que la peroxydation des lipides est directement associée à la nature des acides gras. WILLS (37) note que l'irradiation des microsomes entraîne préférentiellement l'oxydation des acides gras insaturés des phospholipides.

De plus cet auteur signale, ainsi que nous l'avons observé, la formation de fortes quantités de peroxydes dans les microsomes après leur incubation à 4° pendant 20 heures.

La radiosensibilité très marquée des α-lipoprotéines aux rayons X rappelle les travaux de CLARK et coll. (44) relatifs à l'action de l'eau oxygénée sur les lipoprotéines humaines.

Après irradiation, les taux du phosphore lipidique total et des liaisons esters ne subissent pas de variation. Par contre le fractionnement des phospholipides par chromatographie en couche mince révèle la conversion d'une partie des phosphatidylcholines des α-lipoprotéines en une fraction plus polaire sous l'effet des rayons X.

La formation de phospholipides plus polaires peut laisser envisager une activité

lipasique ; l'analyse des liaisons esters permet de rejeter cette éventualité. De plus le dosage du malonaldéhyde et l'analyse chromatographique des acides gras confirment une action peroxydative. L'ensemble de ces résultats est à rapprocher de ceux de MAY et coll. (48) qui, sur les microsomes de foie de rat, constatent une diminution des phosphatidyléthanolamines et l'apparition de composés phospholipidiques à migration lente.

c) L'irradiation entraîne la diminution des acides palmitique et stéarique appartenant aux triglycérides des β-L.P. et des α-L.P.A. et celle de l'acide palmitique des phospholipides de Rf 0,20 des α-L.P.A. Ces variations pourraient être en relation avec un phénomène oxydatif par création d'une double liaison. En effet RAMANATHAN et coll. (66) signalent que la première étape de l'oxydation des acides laurique et stéarique consiste en leur déshydrogénation.

De plus, dans la composition en acides gras des triglycérides des α-L.P.A. irradiées, nous constatons une diminution des acides stéarique et oléique simultanément à une augmentation des acides à chaîne plus courte (inférieure à 15 atomes de carbone). Ce phénomène peut être attribué soit à l'oxydation de l'acide stéarique et conjointement à sa dégradation en produits de scission, soit à une transformation directe de l'acide stéarique en hydroperoxyde ultérieurement scindé en composés à chaîne courte.

Cette dernière hypothèse est conforme au mécanisme d'autoxydation des acides saturés proposé par BRODNITZ et coll. (67). En effet ces auteurs montrent dans l'oxydation de l'acide palmitique l'absence de déshydrogénation et la formation de monohydroperoxyde.

EN RÉSUME, après irradiation des lipoprotéines plasmatiques lyophilisées, nous observons une radiosensibilité très marquée de l'ensemble α-lipoprotéines-albumines qui se manifeste par une augmentation de la tache de Rf 0,20, une élévation du rapport $\frac{\text{ester}}{\text{phosphore}}$ de cette tache, une augmentation du taux de malonaldéhyde et enfin une modification des acides gras de ces phospholipides.

Les valeurs des rapports liaisons esters/phosphore prouvent que les taches de Rf 0,20 ($\frac{AGE}{P}$ 1,5 et 1,2 suivant les lipoprotéines) sont en réalité un mélange de lysodérivés (AGE/P = 1,0) et de lécithines (AGE/P = 2,0).

Le Rf anormal des lécithines (0,20 au lieu de 0,38) laisse supposer une modification d'une partie de ces phospholipides au cours de l'irradiation. La chromatographie en phase gazeuse montre que dans les lécithines (Rf 0,38) les acides gras sont inchangés après irradiation ; par contre les phospholipides de Rf 0,20 contiennent des proportions moindres de certains acides gras insaturés : acide linoléique et acide arachidonique en particulier.

De plus ces modifications dans les lipides des α-lipoprotéines s'accompagnent d'une augmentation de malonaldéhyde.

L'ensemble de ces résultats permet de penser que les radiations ionisantes entraînent des modifications dans la structure des lécithines, en particulier la peroxydation des acides linoléique et arachidonique, suivie d'un raccourcissement de leurs chaînes acylées et de la libération de molécules de malonaldéhyde.

Nos résultats nous ont incitée à séparer dans les α-lipoprotéines plasmatiques irradiées les lécithines modifiées des lysolécithines.

B - Etude analytique des lécithines modifiées par l'irradiation

Dans cette partie de notre travail, nous nous intéressons exclusivement à la fraction α-L.P.A. qui présente la plus grande radiosensibilité.

RESULTATS.

Nous envisageons successivement :

1 - la séparation des phospholipides ,
2 - leur identification,
3 - l'analyse des chaînes acylées par chromatographie en phase gazeuse.

1 - Séparation des phospholipides.

La séparation bidimensionnelle des phospholipides des α-L.P.A. irradiées (figure 3) fait apparaître trois groupes de taches : A (lécithines), B (sphingomyélines) et C. La tache C représentant classiquement les lysolécithines est en réalité subdivisée en deux spots $C_1$ et $C_2$ qui ont des Rf respectivement de 0,17 et 0,25 dans le solvant acide et de 0,56 et 0,55 dans le solvant basique.

La proportion de lécithines ainsi transformées est en moyenne de 15 %.

2 - Rapport liaisons esters/phosphore des phospholipides de Rf 0,20.

Toutes ces taches sont phosphorées comme le montre le réactif de ZINZADZE (233).

Les rapports acides gras estérifiés/phosphore dans les taches $C_1$ et $C_2$ sont de 1,9 pour $C_1$ et de 1,1 pour $C_2$.

Ces valeurs sont en faveur d'une nature lécithinique pour le spot $C_1$ ($\frac{AGE}{P} = 1,9$) et d'une nature lysolécithinique pour le spot $C_2$ ($\frac{AGE}{P} = 1,1$) ; elles permettent de conclure à l'apparition de nouvelles lécithines au cours de l'irradiation des lipoprotéines plasmatiques.

Ces résultats confirment les données établies antérieurement (tableau IV).

**FIGURE 3** - Séparation par chromatographie bidimensionnelle de phospholipides des α-lipoprotéines plasmatiques irradiées.

Solvants 1 : chloroforme, méthanol, eau, acide acétique
(60 : 30 : 6 : 1, v/v/v/v)

2 : chloroforme, méthanol, ammoniaque 7 N
(65 : 35 : 5 , v/v/v).

Révélation : vapeurs d'iode.

A : lécithines, B : sphingomyélines, $C_1$ : lécithines modifiées par l'irradiation, $C_2$ : lysolécithines.

3 - Analyse des chaînes acylées par chromatographie en phase gazeuse.

Cette analyse chromatographique est effectuée sur les taches A, $C_1$ et $C_2$ isolées par chromatographie bidimensionnelle et dont les composés méthylés sont séparés sur chromatoplaque.

La figure 4 représente les migrations chromatographiques des produits de méthanolyse des taches $C_1$ et $C_2$. La comparaison de ces migrations (pistes 4 et 5) avec celles des témoins de diméthylacétal (piste 1) de Rf 0,25 et d'ester méthylique (piste 2) de Rf 0,45 prouve la présence simultanée de ces deux dérivés méthylés dans la fraction lécithinique $C_1$ apparue au cours de l'irradiation, tandis que la fraction lysolécithinique $C_2$ irradiée contient presque exclusivement des esters méthyliques.

De plus, le Rf du dérivé méthylé de l'acide nonanal-9-oïque (9 : O DMA-EM) est identique à celui des diméthylacétals ; de même l'acide nonanal-9-oïque a un Rf semblable à celui de l'aldéhyde libre.

Le composé méthylé de faible Rf proche du point de départ, signalé par HOEVET (234) et par VISWANATHAN et coll. (235) peut être assimilé à des hydroxy-esters méthyliques. Le témoin d'ester méthylique d'acide 12-hydroxy-stéarique (piste 3 de la figure 4) confirme la présence d'hydroxy-acides dans les taches $C_1$ lécithiniques et $C_2$ lysolécithiniques.

La chromatographie en phase gazeuse permet de compléter les résultats obtenus sur couche mince (tableau XII).

Après irradiation, seules les lécithines $C_1$ contiennent des chaînes de moins de 14 atomes de carbone représentant 38,6 % des chaînes totales. L'un des acides peut être identifié au produit de méthylation de l'acide nonanal-9-oïque. Ces mêmes dérivés sont absents des lysolécithines.

La comparaison des taux d'acides gras saturés et d'acides gras insaturés (Tableau XII) dans les spots lécithiniques et lysolécithiniques montre une diminution très nette des acides gras insaturés dans la nouvelle fraction lécithinique $C_1$ 9,6 % contre 22,3 % dans les lysolécithines et 51,3 % dans les lécithines non transformées. Les acides gras les plus altérés par les radiations ionisantes sont en effet l'acide oléique (4,5 % dans la fraction $C_1$ au lieu de 20,7 % dans les lécithines non modifiées), l'acide linoléique (5,1 % au lieu de 20,6 %) et l'acide arachidonique qui disparaît dans la fraction $C_1$.

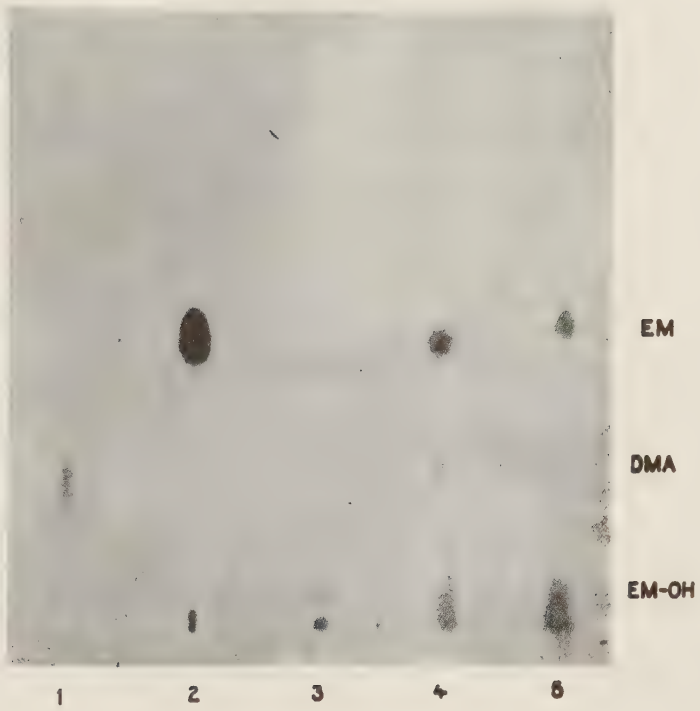



FIGURE 4 - Séparation chromatographique de diméthylacétals (DMA) et d'esters méthyliques (EM).

Solvant : benzène.

Révélation : vapeurs d'iode.

1 - témoin de diméthylacétal d'hexanal.

2 - témoin d'esters méthyliques d'acide palmitique et d'acide linoléique.

3 - témoin d'ester méthylique d'acide 12-OH-stéarique (EM-OH).

4 - produits de méthylation de la tache lécithinique $C_1$.

5 - produits de méthylation de la tache lysolécithinique $C_2$.

| | Fraction lécithinique A | Fraction lécithinique $C_1$ | Fraction lysolécithinique $C_2$ |
|---|---|---|---|
| non id. | - | 3,6 | - |
| 6 : O Ald | - | 7,2 | - |
| non id. | - | 10,8 | - |
| 6 : O EM | - | 8,5 | - |
| 9 : O DMA-EM | - | 8,5 | - |
| 14 : O EM | - | 3,7 | 5,6 |
| non id. | - | 4,2 | traces |
| 16 : O EM | 30,5 | 27,5 | 60,0 |
| non id. | - | 2,4 | - |
| non id. | - | 2,1 | - |
| 18 : O EM | 18,2 | 11,9 | 12,1 |
| 18 : 1 EM | 20,7 | 4,5 | 10,7 |
| 18 : 2 EM | 20,6 | 5,1 | 11,6 |
| 18 : 3 EM | traces | - | - |
| 20 : 4 EM | 10 | - | - |
| Saturés | 48,7 | 90,4 | 77,7 |
| Insaturés | 51,3 | 9,6 | 22,3 |

TABLEAU XII - Composition des chaînes acylées des phosphatidylcholines et lysophosphatidylcholines des α-lipoprotéines-albumines irradiées.

EM : ester méthylique,

Ald : aldéhyde,

DMA-EM : diméthylacétal-ester méthylique.

Nous avons de plus observé dans la fraction lécithinique $C_1$ la présence d'aldéhydes libres qui subsistent sous cette même forme malgré leur méthylation.

Les composés non identifiés, malgré de nombreux témoins d'acides et d'aldéhydes à courte longueur de chaîne, pourraient être des esters méthyliques dont l'autre carbone terminal serait porteur d'un groupement diméthylacétal, témoin d'une fonction aldéhyde formée au cours de la peroxydation.

La présence de tels composés aldéhydiques explique la migration plus lente des nouveaux composés phospholipidiques $C_1$. Ces diminutions importantes des acides gras saturés accompagnées de la formation de composés aldéhydiques expliquent l'apparition de malonaldéhyde formé au cours de l'irradiation des α-L.P.A.

## DISCUSSION

Cette action des radiations ionisantes sur les lécithines des α-L.P.A. avec la formation de composés plus polaires est à rapprocher de l'oxydation du TPNH dans les microsomes de foie de rat observée par MAY et coll. (48), puis par MAY et Mc CAY (95), au cours de laquelle l'apparition de composés phospholipidiques à migration lente est observée dans les phosphatidyléthanolamines. Celle-ci serait due à la formation d'aldéhydes liés aux phospholipides ; des composés de ce type migreraient plus lentement en couche mince.

Pour notre part, nous n'avons pas observé un phénomène identique dans les céphalines après irradiation. Ceci est peut-être dû à la faible proportion de ces phospholipides dans les lipoprotéines plasmatiques. JACOB et LUX (43) démontrent que dans la membrane globulaire, les phosphatidyléthanolamines sont les phospholipides les plus vulnérables à l'action de l'eau oxygénée.

CLARK et coll. (44) signalent la formation d'une forme plus polaire d'esters de cholestérol dans les α-lipoprotéines traitées par l'eau oxygénée.

CHUNG et coll. (94) étudiant les lipides de levure exposée aux rayons γ montrent une élévation du phosphore de la fraction polaire.

DODGE et PHILLIPS (52) signalent également l'oxydation des lipides globulaires par simple passage sur colonne d'acide silicique. Ils observent la diminution des phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines et l'augmentation de fractions plus polaires. Parallèlement, ils notent la diminution des acides linoléique et arachidonique.

La présence d'aldéhydes libres dans les mélanges de lipides méthanolysés est signalée par MAHADEVAN et coll. (236), elle serait due à la conversion incomplète des aldéhydes en diméthylacétals ou au passage des diméthylacétals en aldéhydes.

EN RESUME, les lécithines altérées sont séparées des lysodérivés par la chromatographie en double dimension. La chromatographie en phase gazeuse permet de montrer que l'action des radiations ionisantes sur les lécithines des α-L.P.A. plasmatiques consiste en un raccourcissement de la chaîne d'acides gras insaturés et en l'apparition de dérivés aldéhydo-acides.

II - Effet des rayons X sur les lipides plasmatiques.

Cette partie de notre travail est constituée par l'étude de l'action des rayons X sur le plasma d'une part et sur le sang d'autre part.

RESULTATS.

1 - Formation de peroxydes lipidiques.

L'irradiation du sang total et du plasma conduit à la formation de peroxydes lipidiques. Les figures 5 et 6 représentent les variations du taux de malonaldéhyde selon les doses de radiation.

Il y a une différence très nette entre les deux types de courbes : en effet dans le sang une dose faible de rayons X (500 roentgens) entraîne l'apparition d'un taux de peroxydes double de celui du témoin, tandis que dans le plasma le même taux est atteint pour une dose de 10 000 roentgens, soit 20 fois plus élevée.

2 - Chromatographie en phase gazeuse des acides gras.

Le tableau XIII résume les résultats concernant l'analyse des acides gras des phospholipides plasmatiques après irradiation du sang par les rayons X.

| Acides gras | Sang non irradié | 1 500 R | 5 000 R | 20 000 R |
|---|---|---|---|---|
| 16 : 0 | 43,8 | 44,1 | 43,5 | 47,4 |
| 18 : 0 | 18,0 | 19,3 | 20,0 | 18,6 |
| 18 : 1 | 10,7 | 11,6 | 11,6 | 10,3 |
| 18 : 2 | 13,8 | 14,4 | 16,6 | 14,4 |
| 20 : 0 | 1,9 | traces | traces | traces |
| 20 : 4 | 11,9 | 9,8 | 8,3 | 9,2 |
| Saturés | 63,7 | 63,6 | 63,5 | 66,0 |
| Insaturés | 36,3 | 36,3 | 36,5 | 33 9 |

TABLEAU XIII - Composition des chaînes acylées des phospholipides en fonction de la dose d'irradiation. (Chiffres exprimés en pourcentage des acides gras totaux).

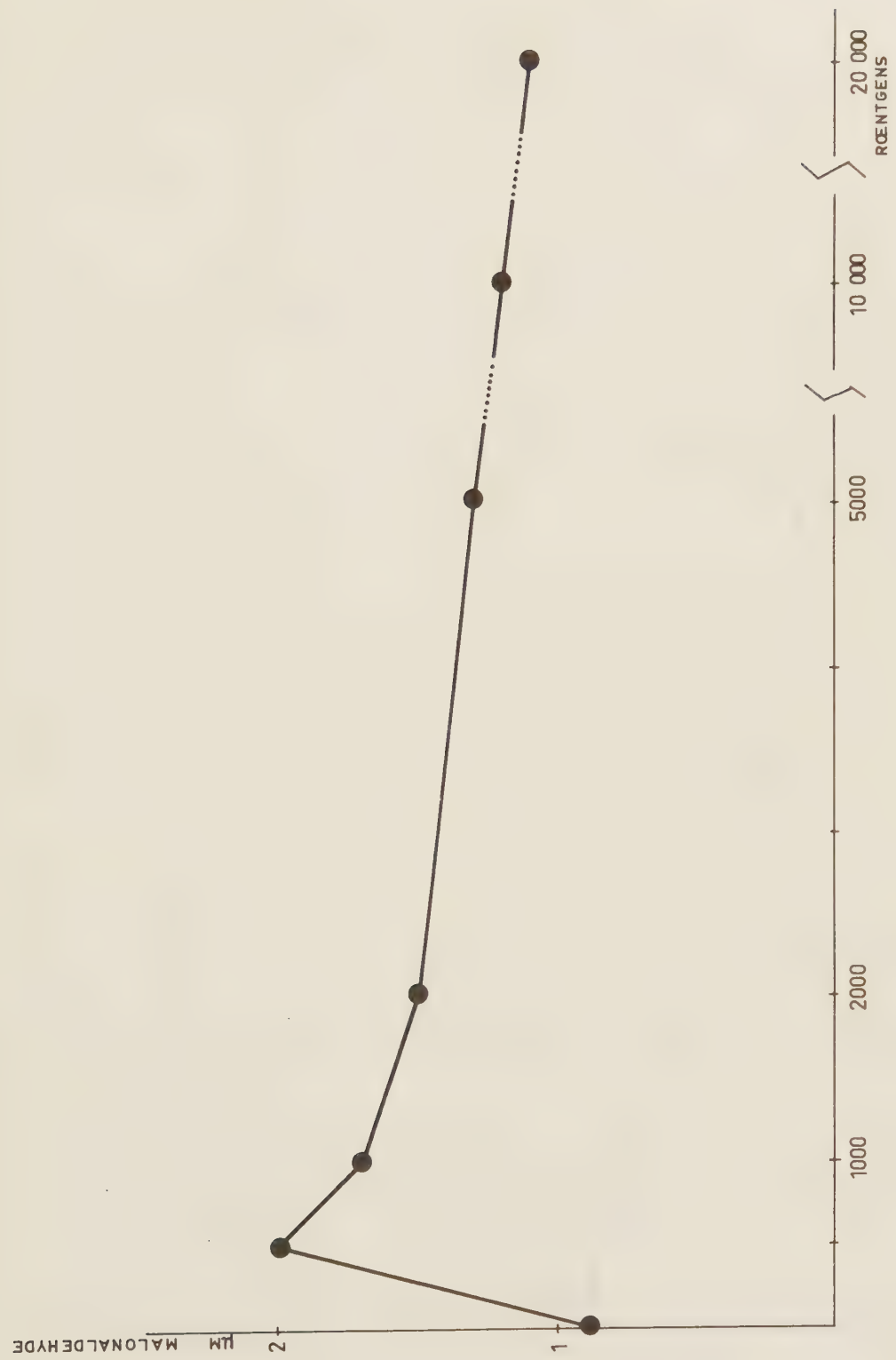



FIGURE 5 - Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques après exposition de sang aux rayons X.

FIGURE 6 - Variation des peroxydes lipidiques après exposition de plasma aux rayons X.

Les proportions d'acides gras saturés et d'acides gras insaturés présents dans les phospholipides ne sont pas modifiées par l'action des rayons X. Nous n'avons pas entrepris l'étude détaillée des acides gras de chaque unité phospholipidique, comme nous l'avions fait lors de l'étude de l'irradiation des lipoprotéines plasmatiques.

DISCUSSION.

Le sang et le plasma réagissent donc différemment à l'action des rayons X. Cette divergence des courbes de peroxydation dans le plasma et dans le sang total nous a incitée à rechercher l'action éventuelle des peroxydes lipidiques sur les groupements thiols sanguins.

Nous avons dosé les groupements thiols dans le plasma d'une part, dans le sang d'autre part, en fonction de la dose d'irradiation *.

Le tableau XIV montre les variations comparées exprimées en pourcentages de la perte des groupements -SH contenus dans le plasma et dans le sang en fonction de la dose d'irradiation.

| Dose d'irradiation Roentgens | Perte de SH (%) | |
|---|---|---|
| | Plasma | Sang |
| 500 | 27,2 | 42,8 |
| 1 000 | 27,2 | 51,4 |
| 5 000 | 27,2 | 40 |
| 10 000 | 36,3 | 28,5 |
| 20 000 | - | 8,5 |

TABLEAU XIV - Effets des rayons X sur les groupements -SH sanguins.

Ce tableau permet de constater que, comme nous l'avons observé pour le dosage des peroxydes lipidiques, l'évolution des groupements -SH dans le plasma et dans le sang est différente.

Dans le plasma, les groupements thiols diminuent (figure 7). Ceci confirme les résultats apportés par plusieurs auteurs sur le devenir des groupements thiols au cours de l'irradiation cellulaire. WILLS (193), LITTLE et O'BRIEN (195) ont montré que des composés thiols tel que le glutathion réduit sont oxydés in vitro par contact avec les lipides peroxydés.

* Nous avons utilisé la technique d'ELLMAN (237) sur une prise aliquote de 0,2 ml de plasma ou de 20 µl de sang total. Une gamme étalon est établie parallèlement, elle est constituée de chlorhydrate de cystéine en solution aqueuse et s'échelonne entre 0,1 µM et 0,5 µM.

FIGURE 7 - Variation du taux de groupements thiols après exposition de plasma aux rayons X.

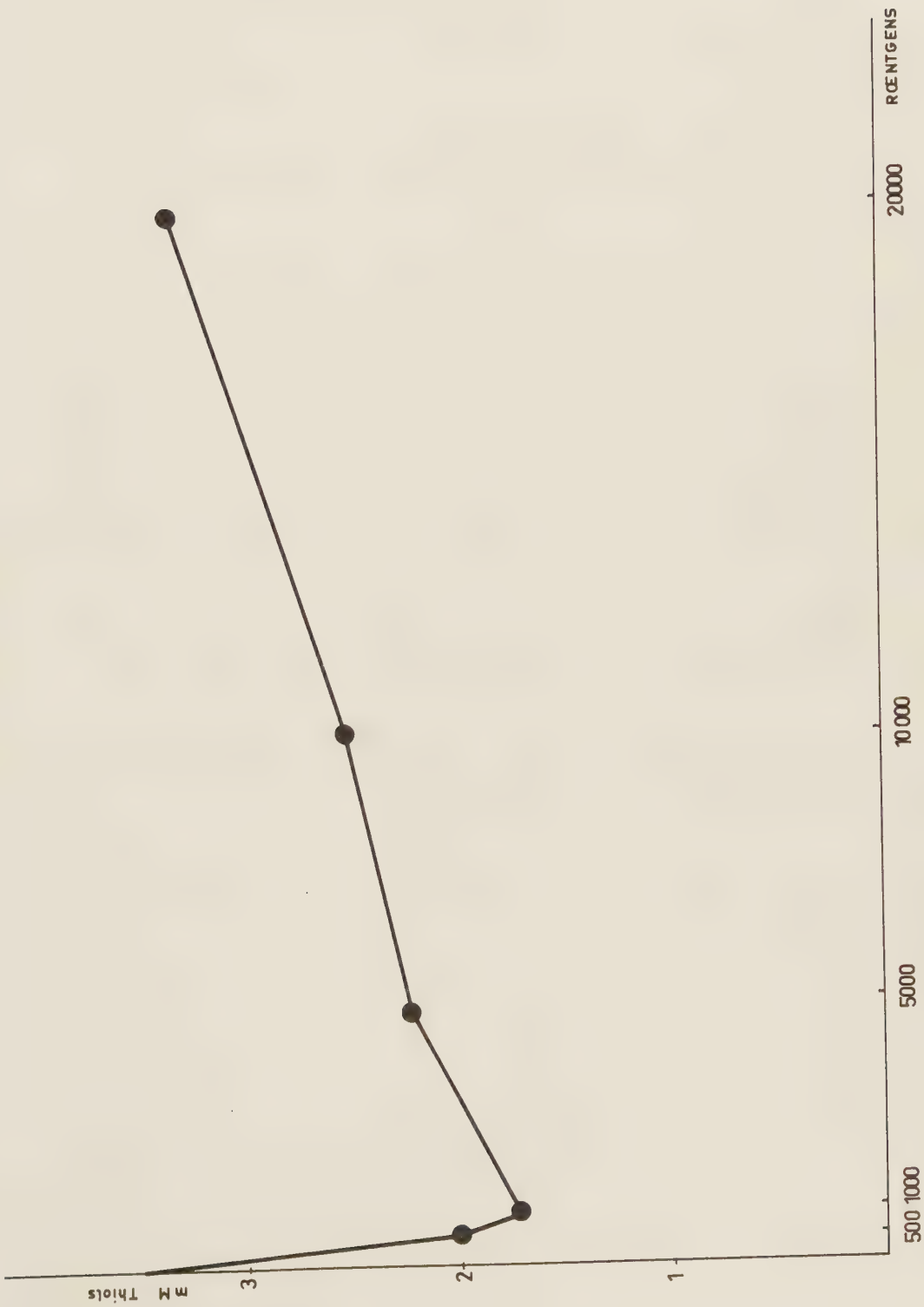



FIGURE 8 - Variation du taux de groupements thiols après exposition de sang aux rayons X.

JACOB et LUX (43) également signalent la diminution des groupements thiols titrables de la membrane globulaire exposée à un agent oxydant tel que l'eau oxygénée dans les hématies provenant d'individus déficients en vitamine E.

SUTHERLAND et coll. (209) montrent l'implication des groupements -SH dans les radiolésions de la membrane globulaire humaine et la perte de ces groupements provoquant l'altération de la membrane.

Cette diminution du taux des groupements thiols, que nous avons observée, serait due à une oxydation en groupements disulfures.

Par contre, nous avons vu que dans le sang, les groupements thiols dosés s'abaissent de 51,4 % pour une dose de l'ordre de 1000 roentgens, mais ensuite sont rétablis à leur taux presque normal (figure 8).

Ce retour à la normale du taux des groupements -SH observé à partir d'une dose d'environ 5 000 roentgens ne doit pas être attribué à une restitution identique à celle observée par MYERS et BIDE (38) au cours de l'irradiation par les rayons X des globules de rat. En effet, le dosage des groupements thiols s'effectue 20 heures après l'irradiation par les rayons X et pour chaque dose il est fait au même moment.

Le retour du taux des groupements thiols à sa valeur initiale, c'est-à-dire sans source d'irradiation, que nous avons observé pour une dose de 20 000 roentgens confirme les résultats du dosage du malonaldéhyde, à savoir un retour à la normale des peroxydes lipidiques pour une dose d'irradiation de 20 000 roentgens (comparaison des figures 7 et 8).

EN RESUME, au cours de l'irradiation par les rayons X, nous observons une différence très marquée entre le comportement du plasma et celui du sang total.

1 - Tout d'abord la peroxydation du plasma augmente en fonction de la dose d'irradiation ; par contre celle du sang total présente un maximum pour une dose relativement faible, puis se stabilise et même diminue.

2 - Le taux de groupements thiols varie en sens inverse de celui de peroxydes lipidiques.

FIGURE 9 - Variation des peroxydes lipidiques après exposition de plasma lyophilisé aux rayons X.

FIGURE 10 - Variation des peroxydes lipidiques après exposition aux rayons X de lipoprotéines plasmatiques lyophilisées.

III - Comparaison de la peroxydation lipidique dans les α-lipoprotéines et dans le plasma.

La quasi absence de modification des acides gras plasmatiques et sanguins opposée à l'apparition de lécithines plus polaires dans les α-lipoprotéines lyophilisées laisse soupçonner l'existence de facteurs plasmatiques de protection à l'égard des radiations ionisantes.

En effet l'exposition de plasma et de α- L.P.A. lyophilisés à des doses croissantes de rayons X (1 000 roentgens/minute) s'accompagne d'une formation de malonaldéhyde (AM) différente dans le plasma et dans les α-L.P.A. (figures 9 et 10).

Le calcul du G (nombre de molécules de malonaldéhyde produites pour 100 eV) confirme ces résultats (tableau XV).

| Dose (roentgens) | Lipoprotéines | Plasma |
|---|---|---|
| 250 | 24,6 | - |
| 500 | 15 | 1,32 |
| 1 000 | 6,6 | 0,66 |
| 5 000 | 0,19 | 1,02 |
| 10 000 | 0,14 | 0,96 |

TABLEAU XV - Valeurs $G_{AM}$ en fonction de la dose de rayonnement.

Pour de faibles valeurs de rayonnement, le nombre de molécules de malonaldéhyde formées est plus élevé dans les α-lipoprotéines que dans le plasma.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de CLARK et coll. (44). Ces auteurs montrent que l'addition d'eau oxygénée entraîne des effets moins marqués dans le sérum que dans des solutions de lipoprotéines isolées. Cette différence significative refléterait, selon ces mêmes auteurs, le fait que le sérum contient des facteurs de protection, protéines, glutathion, acide ascorbique et tocophérols.

DANCEWICZ et coll. (238) notent également dans des homogénats de foie de rat irradiés, que le taux de peroxydes ne subit pas de variation alors que dans les noyaux, mitochondries et microsomes, il y a augmentation des peroxydes. Un facteur antioxydant serait présent dans la fraction soluble du cytoplasme et serait responsable de cette absence d'élévation du taux de peroxydes. Cet antioxydant ne serait pas éliminé par la dialyse.

# CHAPITRE II

## ACTION DES RAYONS β SUR LE SANG

I - Formation de peroxydes lipidiques.

RESULTATS

1 - Influence de la dose de radioactivité
2 - Influence du temps de contact.

DISCUSSION

II - Facteurs chimiques de la peroxydation lipidique du sang.

RESULTATS

1 - Influence de l'hydroquinone
2 - Influence de la sérumalbumine
3 - Influence des sels ferreux
4 - Influence de l'éthylène diamine tétraacétate de sodium (EDTA).

DISCUSSION.

# CHAPITRE II

## ACTION DES RAYONS β SUR LE SANG

L'utilisation généralisée des isotopes radioactifs in vivo et in vitro nous a incitée à rechercher la formation éventuelle de peroxydes lipidiques dans le sang incubé en présence d'éléments radioactifs.

Dans un premier temps, nous envisagerons la formation des peroxydes lipidiques provoquée par l'adjonction d'éléments radioactifs au milieu d'incubation.

Dans un deuxième temps, nous étudierons l'action des effecteurs chimiques de cette peroxydation.

### I - Formation de peroxydes lipidiques.

RESULTATS.

Nous rapportons les valeurs des peroxydes lipidiques formés in vitro sous l'influence de $^{32}P$, $^{131}I$ et $^{198}Au$.

1 - en fonction de la radioactivité de 10 à 2 000 μC.

2 - en fonction du temps (de 30' à 24 heures).

1 - Influence de la dose de radioactivité.

La figure 11 rapporte la quantité de peroxydes lipidiques (exprimés en μM de malonaldéhyde pour 1000 ml de plasma) formés en fonction de la dose de radioactivité (en μC) de $^{198}Au$. Elle montre qu'au bout de 6 heures, pour une dose de 500 μC, la quantité de peroxydes est quadruplée. Nous observons de plus que la formation de peroxydes diminue pour des radioactivités supérieures à 700 μC.

La courbe 12 concerne la formation de peroxydes lipidiques formés en fonction d'une dose de radioactivité croissante de $^{32}P$. Le phénomène est identique à celui observé en présence de $^{198}Au$, bien que la quantité de peroxydes varie légèrement avec l'échantillon sanguin.

La figure 13 représente le résultat d'expériences analogues réalisées avec $^{131}I$.

Les trois courbes (figures 11,12 et 13) montrent que la quantité de peroxydes est augmentée sous l'effet de faibles doses d'éléments radioactifs.

Les valeurs G de formation du malonaldéhyde (AM) ne sont pas identiques aux faibles et aux fortes doses (tableau XVI).

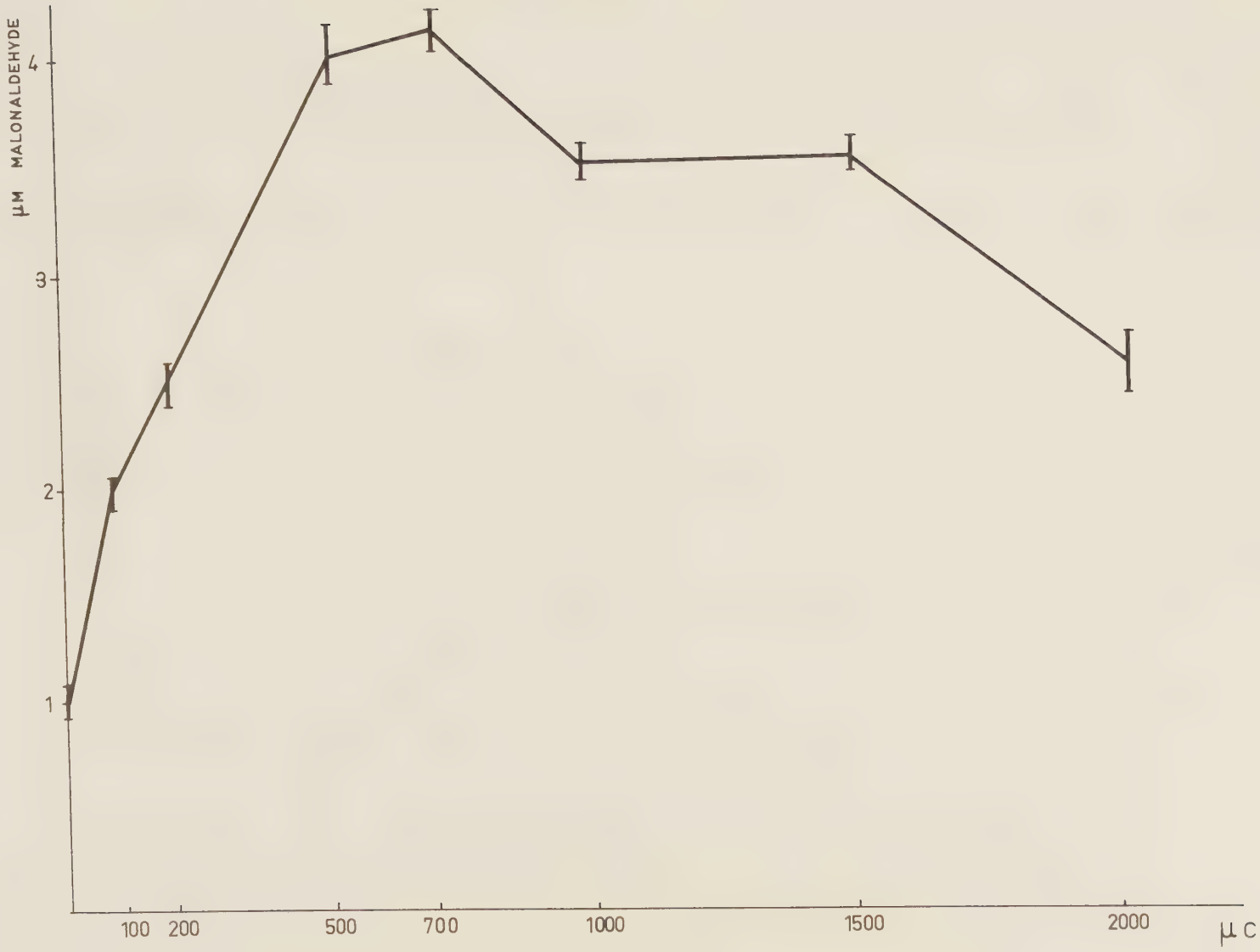



FIGURE 11 - Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques après incubation de sang en présence d'une dose croissante de $^{198}Au$.

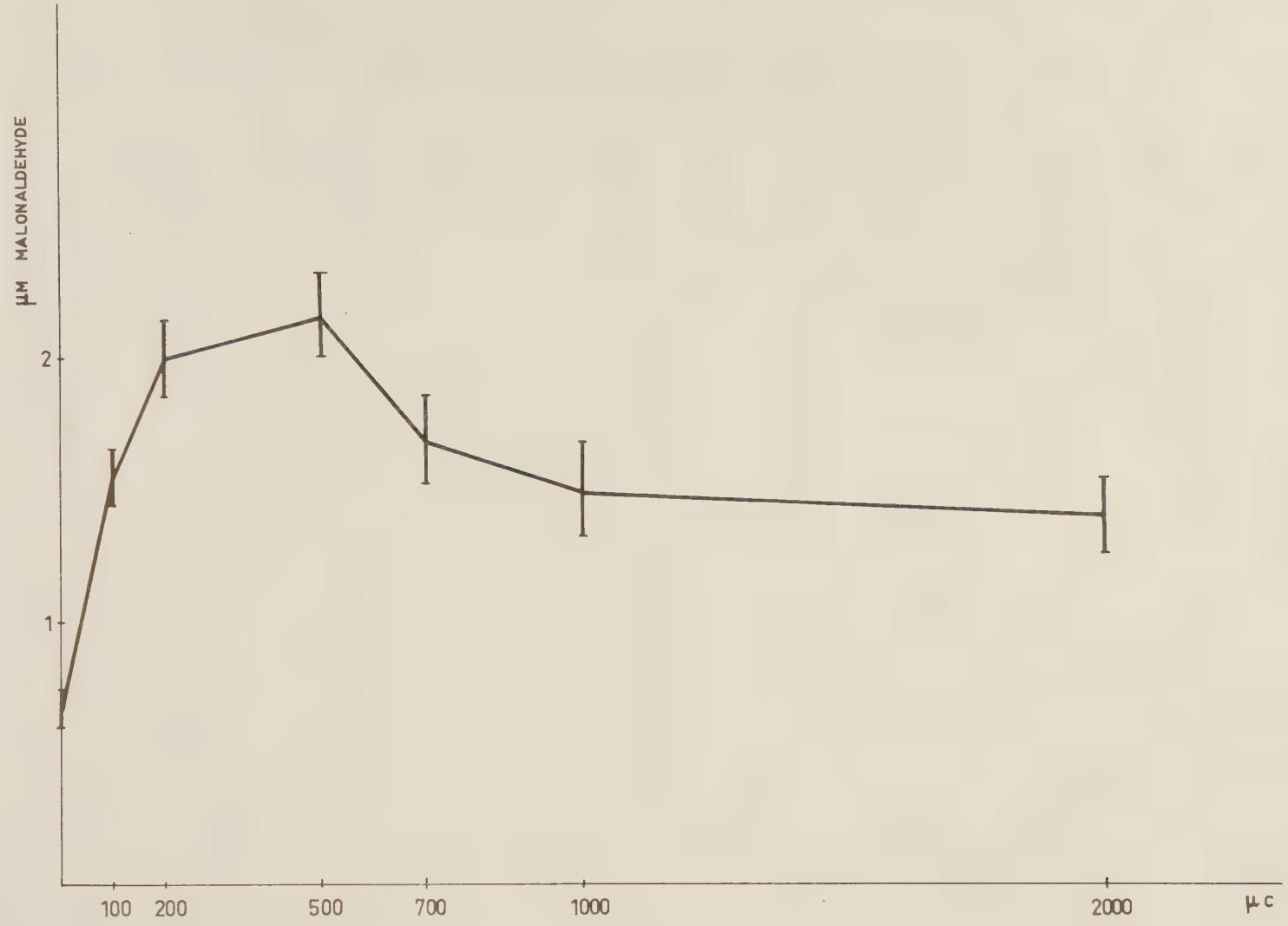



FIGURE 12 - Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques après incubation de sang en présence d'une dose croissante de $^{32}P$.

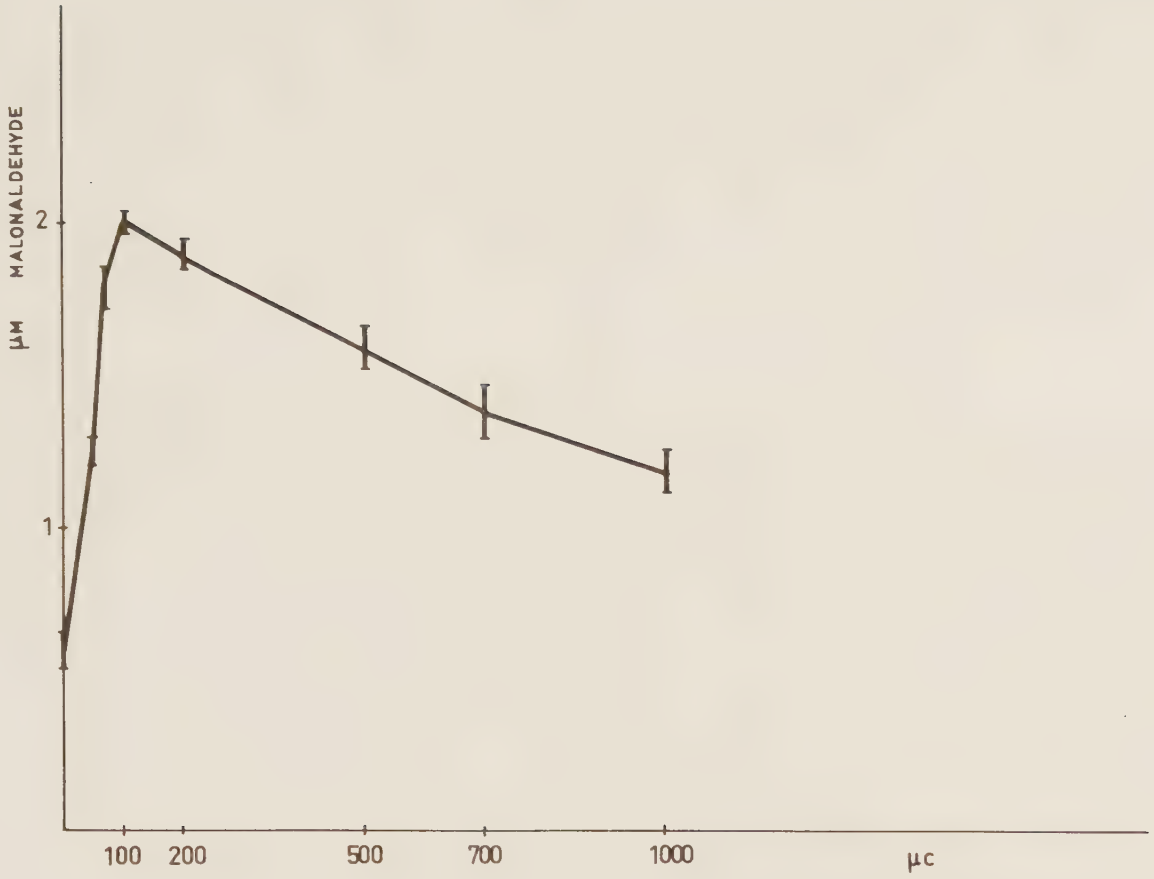



FIGURE 13 - Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques après incubation de sang en présence d'une dose croissante de $^{131}I$.

| Dose de rayonnement en $\mu$C | $^{198}Au$ | | $^{32}P$ | | $^{131}P$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Rads | G | Rads | G | Rads | G |
| 50 | - | - | - | - | 13 | 29 |
| 75 | - | - | - | - | 19 | 45 |
| 100 | 51 | 18,6 | 87 | 8,4 | 25 | 42 |
| 200 | 101 | 12,6 | 174 | 5,4 | 51 | 17 |
| 500 | 253 | 11,4 | 434 | 3 | 128 | 5,2 |
| 700 | 355 | 7,8 | 607 | 1,1 | 179 | 2,4 |
| 1 000 | 507 | 4,5 | - | - | 255 | 0,9 |
| 1 500 | 760 | 3 | - | - | - | - |
| 2 000 | 1 014 | 1,4 | 1 740 | 0,2 | - | - |

TABLEAU XVI - Valeurs $G_{AM}$ en fonction de la nature et de la dose de rayonnement.

L'énergie délivrée par les éléments radioactifs est excessivement faible puisque 2000 $\mu$C de $^{32}P$ par exemple n'équivalent qu'à une énergie de 1 740 rads et à un taux d'irradiation de 4,7 roentgens/minute.

Ce tableau montre que ce sont les doses d'irradiation très faibles qui ont la plus grande efficacité sur la formation du malonaldéhyde. De plus, l'énergie délivrée par les rayons $\beta$ est différente pour chaque élément radioactif, celle de l'iode étant la plus faible et celle du phosphore la plus importante.

2 - Influence du temps de contact.

La figure 14 concerne la formation in vitro des peroxydes lipidiques dans le sang en fonction du temps de contact avec $^{32}P$ ( pour une même radioactivité de 200 $\mu$C).

Les peroxydes lipidiques estimés par le dosage du malonaldéhyde passent de 1,3 $\mu$M à 2,6 $\mu$M au bout de 2 heures d'incubation à 37 °. Le maximum est atteint en 4 heures et ce taux se maintient 24 heures après.

Ce graphique permet également de comparer la radiosensibilité relative du plasma et du sang total. Dans les dix premières minutes de contact, on observe un parallélisme ; les peroxydes se forment aussi bien dans le plasma que dans le sang total. Si le temps de contact se poursuit, les deux courbes se dissocient ; tandis que les peroxydes plasmatiques s'abaissent pour rester à un taux constant, les peroxydes du sang total atteignent une valeur triple. Cette dissociation des deux courbes souligne l'importance des facteurs globulaires.

La figure 15 reproduit l'action des rayons émis par $^{131}I$. Un premier maximum s'observe au bout de 30' tandis qu'une seconde partie de la courbe aboutit à un deuxième maximum au bout de 6 heures. La comparaison des 2 courbes montre que le plasma est le siège d'une peroxydation moindre et que l'absence d'élément radioactif dans le milieu d'incubation est suivie de la persistance du taux de peroxydes initial.

FIGURE 14 - Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques dans le sang (courbe A) et dans le plasma (courbe B) en fonction du temps sous l'influence de 200 µC de $^{32}P$.

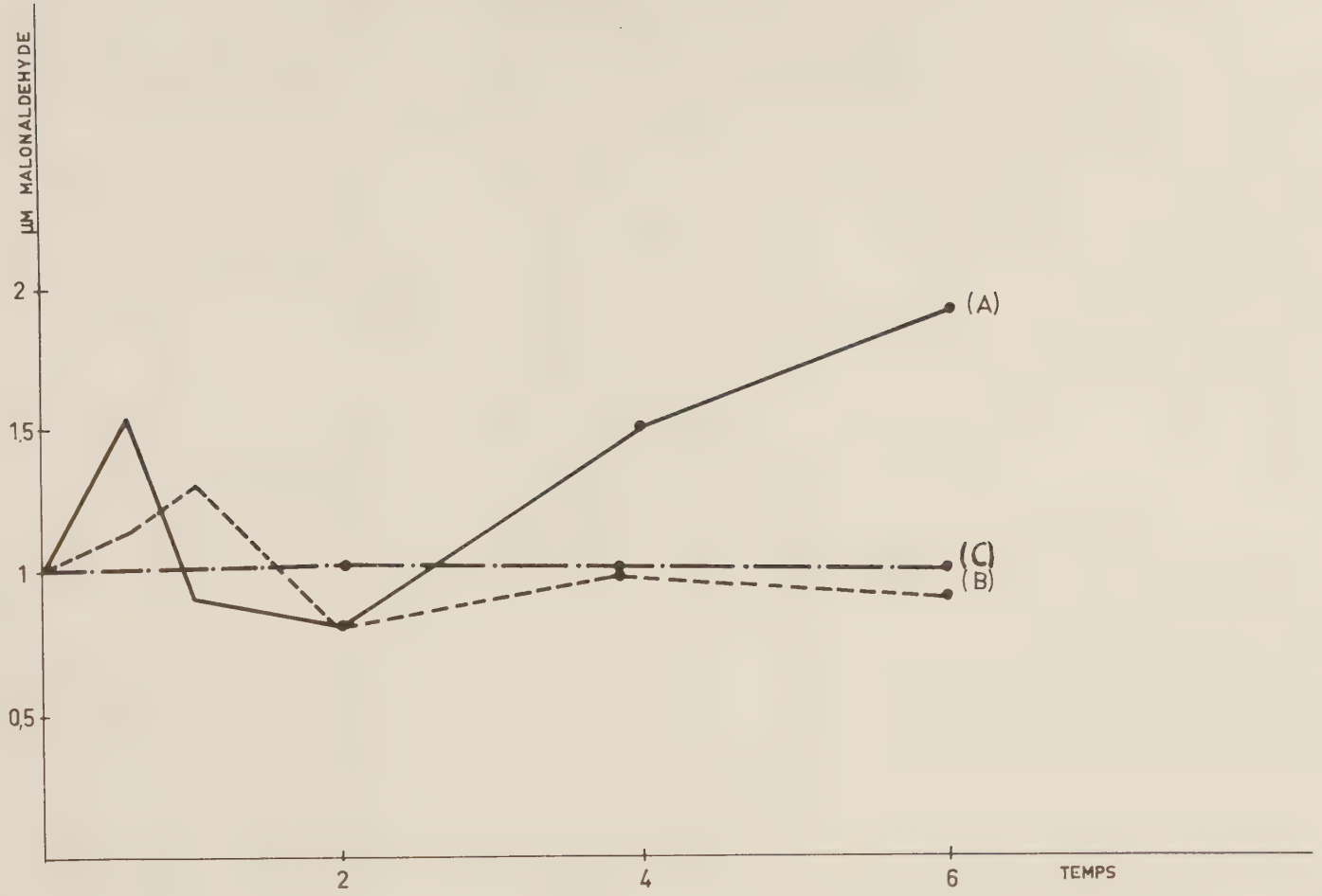



FIGURE 15 - Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques dans le sang (courbe A) et dans le plasma (courbe B) en fonction du temps sous l'influence de 200 µC de $^{131}I$.
Courbe C : sang non irradié

FIGURE 16 -

Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques dans le sang en fonction du temps sous l'influence de 50 µC de $^{198}$Au.

Avec $^{198}Au$ (50 $\mu$C) le taux de malonaldéhyde atteint sa valeur limite au bout de 6 H 30 d'incubation à 37° (figure 16).

DISCUSSION.

Les rayons émis par $^{32}P$, $^{131}I$ et $^{198}Au$ provoquent la formation de peroxydes lipidiques. A la suite de ces résultats, nous avons envisagé la formation de peroxydes lipidiques à partir de solutions témoins d'acides gras additionnées d'éléments radioactifs *.

Après 24 heures d'incubation, 1/300e seulement de l'acide linoléique incubé en présence de $^{32}P$ est transformé en malonaldéhyde. Le spectre de l'acide linoléique incubé pendant 24 heures en présence de $^{32}P$ montre deux pics d'absorption, l'un mineur, vers 282 m$\mu$ et l'autre, plus intense vers 222 m$\mu$ (figure 17). Par contre, l'émulsion d'acide linoléique non incubé présente un spectre nettement différent (figure 17).

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de BAKER et WILSON (40) ; ces auteurs étudient les produits de l'irradiation ultraviolette d'émulsions d'acide linoléique et linolénique et montrent que l'absorption ultraviolette des produits d'irradiation est le résultat de l'absorption d'un minimum de 8 composés différents, chacun montrant une absorption mineure à 260-280 m$\mu$ et une absorption majeure à 200-230 m$\mu$.

L'action des rayons $\beta$ sur l'acide linoléique confirme nos résultats concernant la formation de malonaldéhyde dans le sang mis au contact d'éléments radioactifs.

Le calcul de la dose du rayonnement émis par les éléments radioactifs nous permet de comparer leur action à celle des rayons X. C'est ainsi que pour 200 $\mu$C de $^{32}P$, le débit est d'environ 0,5 roentgen/minute; pour $^{131}I$, il est de 0,10 roentgen/minute et pour 50 $\mu$C de $^{198}Au$, il est de 0,06 roentgen/minute.

Comparé à celui des rayons X, le taux de rayonnement à la minute émis par les éléments radioactifs est excessivement faible et cependant leur action sur la peroxydation lipidique est très importante. Ceci peut être comparé aux résultats de MEAD (8) qui observe à partir d'acide linoléique une augmentation des peroxydes proportionnelle à la dose de rayons X et inversement proportionnelle au taux minute. De plus, WILLS et ROTBLAT (34), irradiant de l'acide linoléique à des débits de doses variables, montrent l'absence de formation de peroxydes lipidiques lorsque la dose est supérieure ou égale à 50 roentgens/minute, alors que la peroxydation se produit à des doses de 25 roentgens/minute.

Nous avons vu lors de l'incubation d'éléments radioactifs que la peroxydation des lipides est plus importante avec le sang qu'avec le plasma.

Ceci pose le problème de l'origine des peroxydes lipidiques. Sont-ils d'origine globulaire ou plasmatique ?

* Le protocole opératoire est le suivant :
30 mg d'acide linoléique sont dissous dans 2 ml d'éthanol et sont additionnés de 18 ml de potasse 0,002 M (34). Le mélange émulsionné est incubé en présence de 200 $\mu$C de $^{32}P$ dans un bain-marie à 37° avec agitation continue. Des incubations identiques sont exécutées avec des temps croissants 1 H, 2 H, 4 H, 6 H, 7 H et 24 H et avec des échantillons témoins. Après 24 heures d'incubation, une prise aliquote est prélevée et le dosage du malonaldéhyde effectué comme nous l'avons déjà préalablement signalé. Les spectres ultraviolets des émulsions d'acide linoléique sont effectués au spectrophotomètre (Beckman DB).

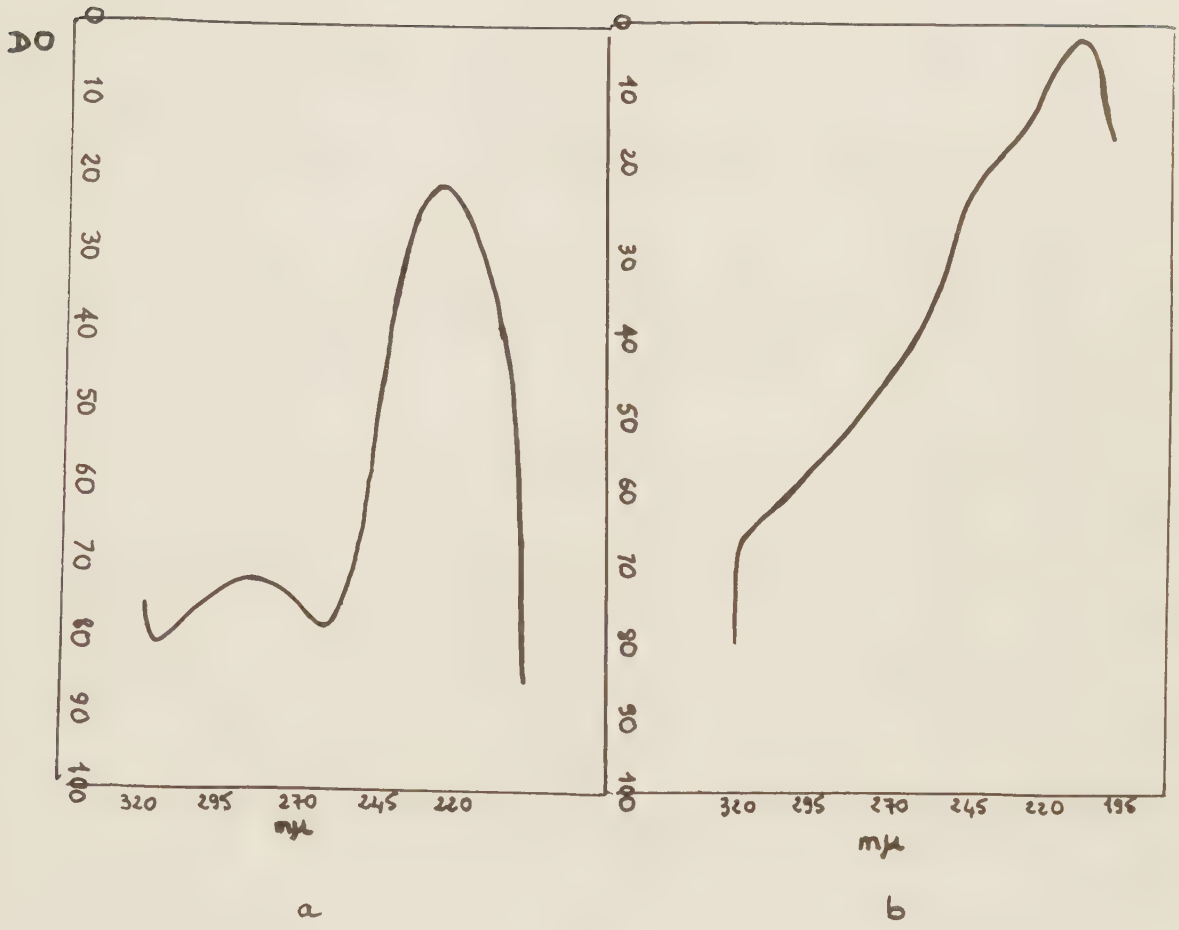



FIGURE 17 - Spectres UV des émulsions d'acide linoléique.

Spectre a : acide linoléique incubé pendant 24 h en présence de 200 μC de $^{32}P$.

Spectre b : acide linoléique non incubé.

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé l'incubation d'hématies humaines en présence de 200 $\mu$C de $^{32}P$ *.

L'incubation d'hématies seules en présence de $^{32}P$ n'entraîne pas l'apparition de peroxydes lipidiques. La peroxydation intéresse donc exclusivement les lipides plasmatiques.

La technique signalée en note pour le dosage du malonaldéhyde globulaire nous a semblé être la meilleure. En effet, les protéines globulaires ne sont pas incubées avec l'acide thiobarbiturique à 100°, ceci évitant la réaction d'un chromogène globulaire avec ce réactif (108). De plus, le dosage des peroxydes lipidiques dans l'extrait lipidique paraît insatisfaisant du fait de la solubilité dans l'eau du malonaldéhyde libre.

Malgré cette absence de peroxydation des lipides globulaires sous l'effet du $^{32}P$, les résultats précédemment observés dans le sang total et dans le plasma (figures 14 et 15) laissent soupçonner un rôle éventuel des facteurs globulaires et des protéines plasmatiques.

EN RESUME, l'incubation de sang en présence d'éléments radioactifs entraîne la formation de peroxydes lipidiques.

Leur taux croît proportionnellement à la dose de radioactivité, il diminue à partir d'une certaine valeur, comprise entre 100 $\mu$C et 700 $\mu$C selon l'élément radioactif considéré.

La quantité de peroxydes augmente avec la durée d'incubation ; le maximum est atteint après 3 à 7 heures d'incubation suivant l'élément radioactif. De plus la peroxydation des lipides est plus importante dans le sang total que dans le plasma.

II - Facteurs chimiques de la peroxydation lipidique du sang.

RESULTATS.

Nous rapportons ci-dessous les valeurs des peroxydes lipidiques formés sous l'influence du $^{32}P$ (200 $\mu$C) en présence de quantités croissantes d'hydroquinone, de sérumalbumine, de sulfate ferreux et d'éthylène diamine tétraacétate de sodium.

1 - Influence de l'hydroquinone.

La figure 18 rapporte la quantité de peroxydes lipidiques exprimés en $\mu$M de malonaldéhyde par litre de plasma en fonction d'une dose croissante d'hydroquinone de 2 à 10 $\mu$M en présence de $^{32}P$. Le taux de malonaldéhyde est abaissé en présence de 4 $\mu$M d'hydroquinone, mais ne subit aucun changement à des doses plus élevées de cet antioxydant.

* La technique de dosage du malonaldéhyde globulaire est différente de la méthode utilisée pour le plasma.
Nous opérons de la manière suivante :
1 ml de globules rouges subit un préchauffage de 1 heure à 100° afin de libérer le malonaldéhyde de la fraction protéique (en effet, nous avons observé que la précipitation par l'acide trichloracétique seul ne libérait pas la totalité du malonaldéhyde). Ensuite le coagulat est repris par 1 ml d'acide trichloracétique à 20 % à la température du laboratoire, agité et centrifugé. Sur le surnageant est effectuée la réaction à l'acide thiobarbiturique.

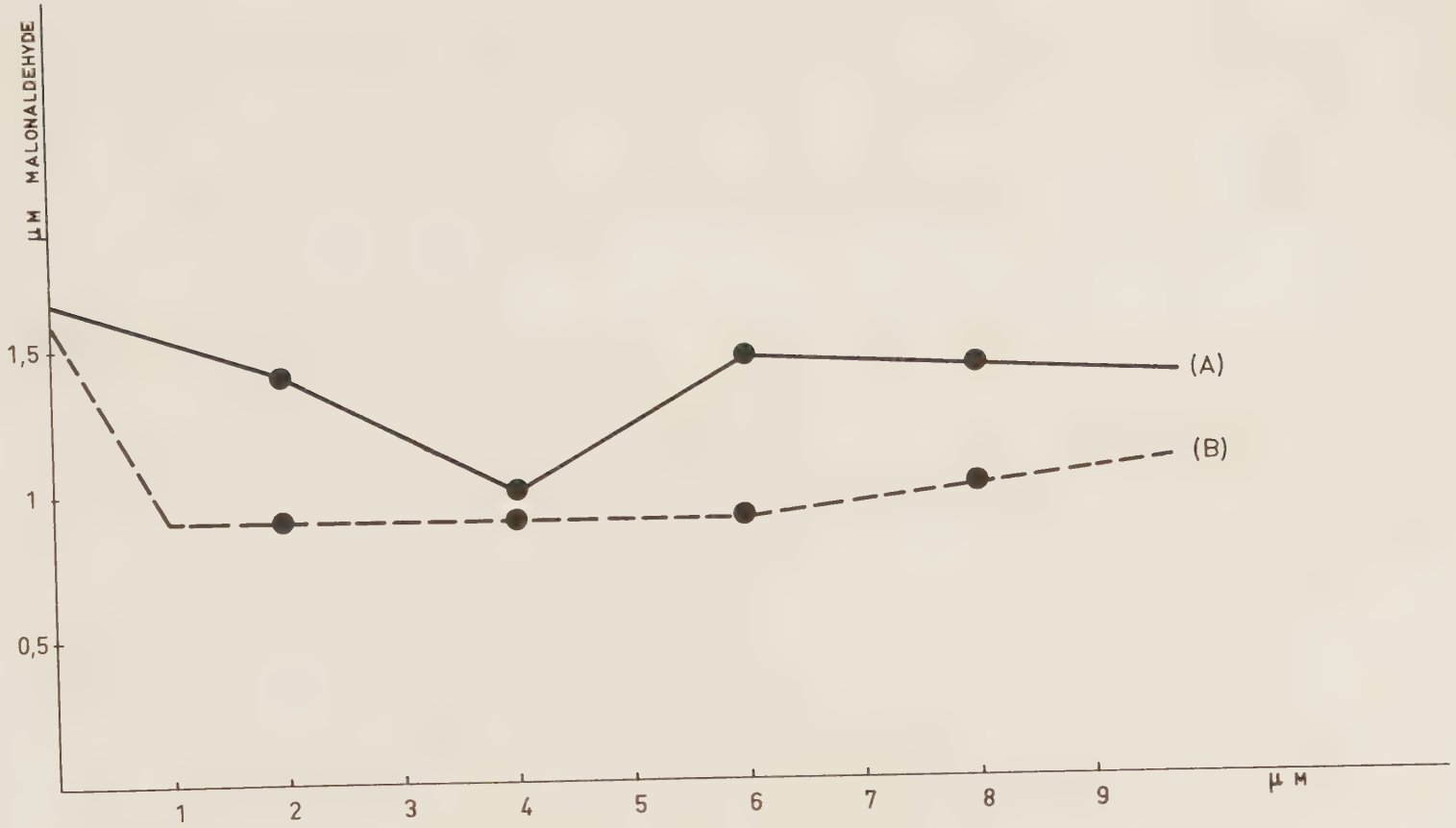



FIGURE 18 - Action de l'hydroquinone (courbe A) et de l'éthylène diamine tétraacétate de sodium (courbe B) sur la formation des peroxydes lipidiques plasmatiques après incubation de sang en présence de 200 µC de $^{32}P$.

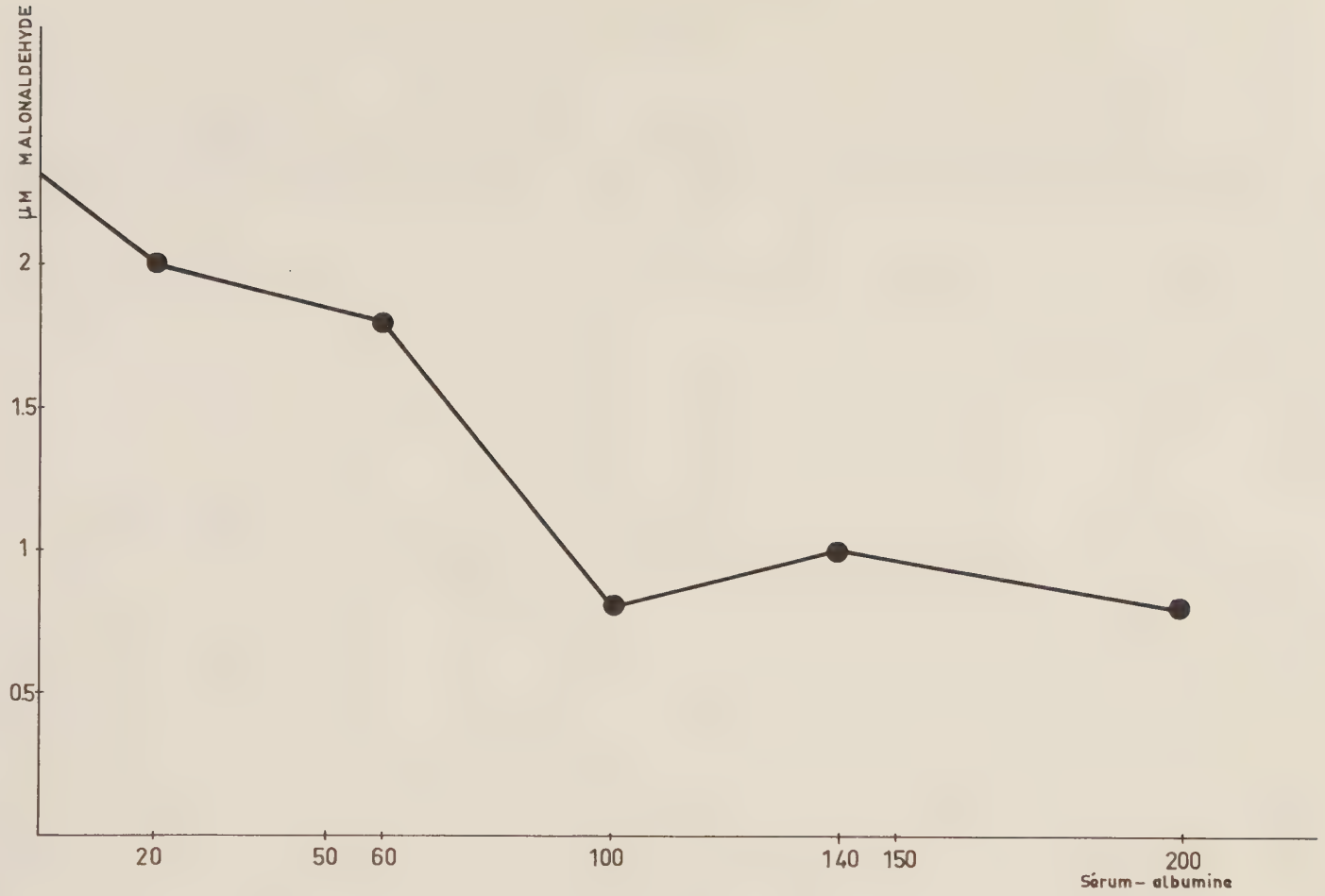



FIGURE 19 - Action de la sérumalbumine humaine sur la formation de peroxydes lipidiques plasmatiques après incubation de sang en présence de 200 µC de $^{32}P$.

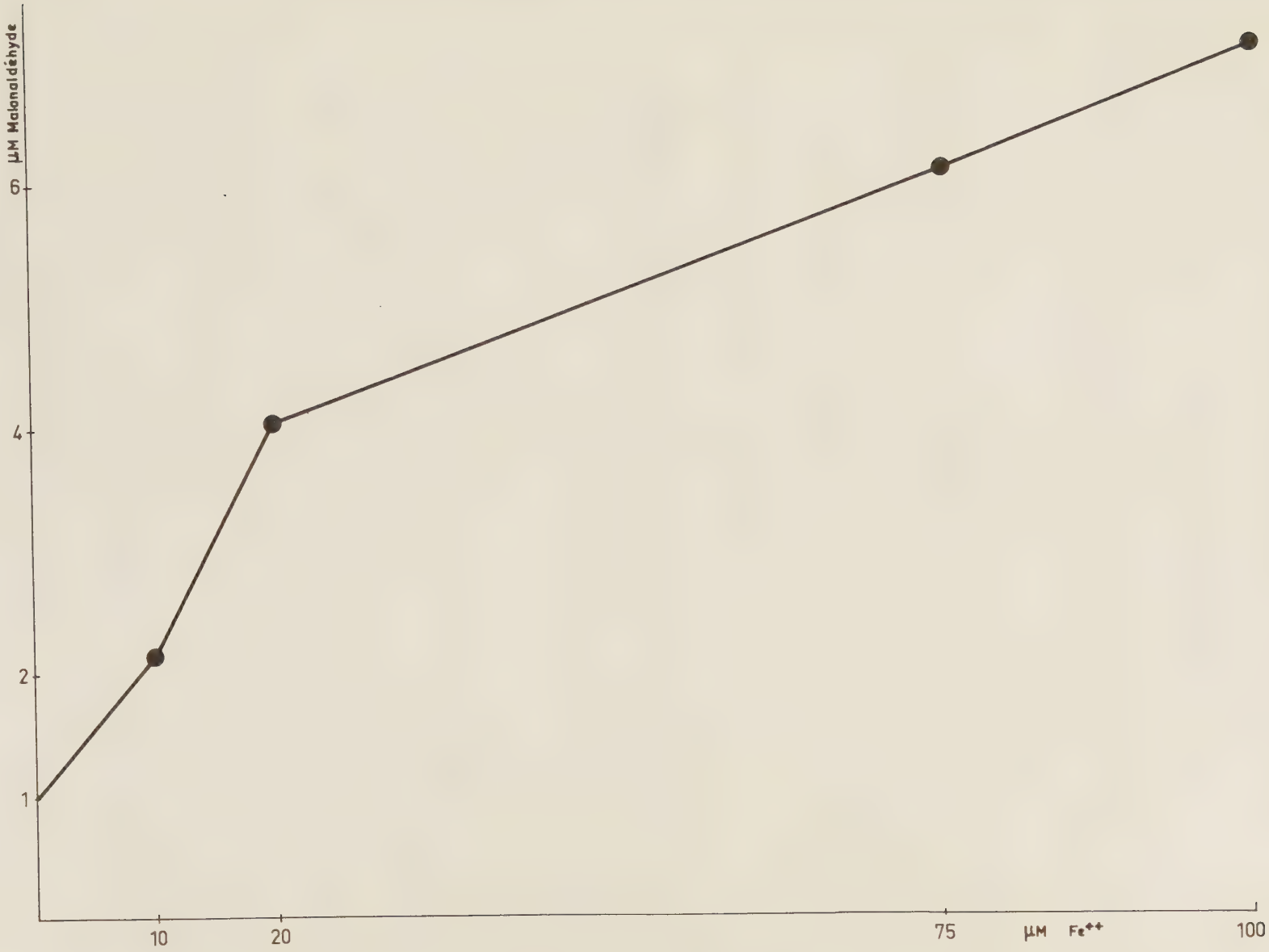



FIGURE 20 - Action du sulfate ferreux sur la formation de peroxydes lipidiques plasmatiques après incubation de sang en présence de 200 µC de $^{32}P$.

L'hydroquinone inhiberait la peroxydation lipidique à faible dose ; par contre, à forte dose elle n'agirait point.

2 - Influence de la sérumalbumine.

La figure 19 représente le taux de peroxydes lipidiques formés en présence de $^{32}P$ et de doses croissantes de sérumalbumine de 20 à 200 mg. En présence de 100 mg de sérumalbumine, la quantité de malonaldéhyde est diminuée de 50%.

3 - Influence des sels ferreux.

La figure 20 rapporte la formation de peroxydes lipidiques en présence d'une dose croissante de sels ferreux. Le taux de malonaldéhyde quadruple en présence de 20 $\mu$M d'ions ferreux et atteint des valeurs 7 fois supérieures à la normale avec 100 $\mu$M de sulfate ferreux.

L'intensité de coloration du témoin n'est par ailleurs pas affectée par les ions $Fe^{2+}$.

4 - Influence de l'éthylène diamine tétraacétate de sodium (EDTA).

L'EDTA a une action inhibitrice totale sur la formation de peroxydes lipidiques sanguins (figure 18) ; en effet le taux de malonaldéhyde passe de 1,65 $\mu$M en présence de $^{32}P$ sans EDTA à 0,9 pour une dose de 1 $\mu$M d'EDTA ; cette dernière valeur correspond au taux de peroxydes du sang non irradié.

DISCUSSION.

Nos résultats suggèrent que, dans le sang, les réactions de peroxydation sont sous la dépendance de facteurs intrinsèques tels que l'hémoglobine et les protéines plasmatiques.

L'action de l'hydroquinone confirme le rôle catalytique joué par l'hémoglobine dans la formation des peroxydes lipidiques (144) (113) : effet activateur à faible dose et effet inhibiteur à dose plus élevée.

L'influence de la sérumalbumine sur la peroxydation lipidique a fait l'objet d'un certain nombre d'études. WILLS et ROTBLAT (34) ont mis en évidence l'action des protéines sur la peroxydation des lipides ; c'est ainsi qu'une émulsion de lipides de foie irradiée en présence de gélatine ou de sérumalbumine produit une quantité moindre de peroxydes.

KWON et BROWN (160) ont décrit la formation d'un complexe entre la sérumalbumine bovine et le malonaldéhyde dû à la combinaison des groupements aminés de la protéine avec le groupement carbonyle de l'aldéhyde malonique.

A la suite de ces travaux, nous avons envisagé la possibilité de formation d'un complexe analogue entre la sérumalbumine humaine et le malonaldéhyde. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons effectué l'incubation de sérumalbumine humaine avec du malonaldéhyde dans un bain-marie à 37° sous agitation continue.

Le tableau reproduit le protocole expérimental.

| | I | II | III |
|---|---|---|---|
| Sérumalbumine (1) | 2 | - | 2 |
| Malonaldéhyde (2) | - | 1 | 1 |
| Sérum physiologique | 3 | 4 | 2 |

TABLEAU XVII - Protocole expérimental de la mise en évidence de la formation du complexe malonaldéhyde-sérumalbumine humaine (volumes exprimés en ml).

I - témoin de sérumalbumine.
II - témoin de malonaldéhyde.
III - essai : sérumalbumine et malonaldéhyde.

(1) - Sérumalbumine - solution à 17,7 g %
(2) - Malonaldéhyde - solution à $5.10^{-8}$ M/ml.

Le dosage du malonaldéhyde effectué sur 1 ml de chaque incubat montre après 2 heures d'agitation que 52 pour cent du malonaldéhyde de l'essai sont combinés à la sérumalbumine ; ce taux s'accroît jusqu'à 58 % après 24 heures d'incubation.

Ceci est en faveur d'une réelle combinaison du groupement carbonyle de l'aldéhyde avec les groupements aminés de la protéine. Le phénomène est donc identique à celui observé par KWON et BROWN (160) ; en effet la composition en acides aminés des sérumalbumines bovine et humaine est quasi identique.

D'autres protéines ont été également étudiées comme effecteurs de la peroxydation lipidique. C'est ainsi que WILLS (37) signale l'inhibition de la peroxydation microsomiale par la cystéine et le glutathion.

Nous avons en outre effectué l'incubation de cystéine et de malonaldéhyde.

Le tableau XVIII reproduit le processus opératoire.

| | I | II | III |
|---|---|---|---|
| Cystéine (1) | 4 | - | 4 |
| Malonaldéhyde (2) | - | 1 | 1 |
| Sérum physiologique | 1 | 4 | - |

TABLEAU XVIII - Protocole expérimental de la mise en évidence de la formation du complexe malonaldéhyde-cystéine(volumes exprimés en ml).

I - témoin de cystéine.
II - témoin de malonaldéhyde.
III - essai : cystéine et malonaldéhyde.

(1) - Cystéine - solution à 0,7 g %
(2) - Malonaldéhyde - solution à $5.10^{-8}$ M/ml.

Le dosage du malonaldéhyde effectué sur 1 ml de chaque incubat après 24 heures d'agitation à 37° confirme ici également la combinaison de 54 pour cent du malonaldéhyde avec la cystéine. La diminution également du taux des groupements thiols suggère une réaction de ces derniers sur le malonaldéhyde. Les travaux de BUTTKUS (161) mettent en évidence l'action de la cystéine sur le malonaldéhyde à la fois par le groupement aminé et par la fonction thiol.

Le glutathion inhibe, de façon analogue, la peroxydation dans les microsomes et les mitochondries (158) (37). Le rôle inhibiteur exercé par la cystéine rappelle les travaux de LITTLE et O'BRIEN (205) d'une part et de CHRISTOPHERSEN (158) d'autre part qui ont mis en évidence l'inhibition de la peroxydation dans les microsomes et les mitochondries par le glutathion. WILLS (37) montre que les composés thiols, cystéine et glutathion, inhibent la peroxydation des microsomes quand ceux-ci sont incubés en présence de NADPH ou d'acide ascorbique. Cette inhibition s'exercerait totalement lorsqu'il serait introduit au milieu après l'irradiation.

L'action activatrice des ions ferreux a été démontrée par OTTOLENGHI (105) et par Mc KNIGHT et ses collaborateurs (147). L'incubation de mitochondries de foie de rat avec des ions ferreux de 10 à 50 $\mu$M entraîne la formation de peroxydes lipidiques et ces effets activateurs sont abolis par les agents chélateurs. CHRISTOPHERSEN (158) montre que les ions ferreux stimulent la peroxydation lipidique par une "cooxydation" des acides gras insaturés et des ions métalliques, et que l'EDTA inhibe totalement la peroxydation lipidique.

Nous avons obtenu des résultats identiques en utilisant des sels ferriques à la place de sels ferreux; les premiers agiraient en intensifiant la formation du chromophore (148).

WILLS (113) met en évidence l'action activatrice des hémoprotéines sur la peroxydation lipidique lorsque ces protéines sont utilisées à des concentrations inférieures à 10 $\mu$M et inhibitrice à des concentrations supérieures. De plus la peroxydation d'acide linolénique est fortement inhibée par 0,2 $\mu$M d'EDTA.

L'hémoglobine jouant un rôle dans la peroxydation lipidique (144), l'influence du milieu d'incubation sur la peroxydation lipidique doit être recherchée.

WILLS et WILKINSON (36) ont montré que l'azote réduit considérablement le taux de peroxydes lipidiques des mitochondries et des lysosomes tandis que l'oxygène l'augmente. Nous avons observé par ailleurs, dans le cas d'incubation en atmosphère inerte, une peroxydation lipidique induite par les rayons $\beta$ qui est la moitié de celle observée en atmosphère aérobie. De plus en atmosphère oxygénée, les phénomènes d'auto-oxydation sont très importants; de ce fait l'action des rayons $\beta$ sur la peroxydation est moins nette ; le taux de malonaldéhyde atteint les mêmes valeurs que dans le cas d'incubation en atmosphère normale aérobie. Cette dernière constatation rappelle les travaux de WILLS et ROTBLAT (34) qui signalent que lorsque le taux de peroxydes d'échantillons non irradiés est élevé, par suite par exemple d'une incubation prolongée à 37°, les effets de l'irradiation sont faibles.

EN RESUME, l'étude partielle des effecteurs de la peroxydation lipidique du sang permet de confirmer :

1 - l'inhibition de la peroxydation lipidique par l'hydroquinone à dose faible et l'absence d'effet à dose élevée,

2 - l'effet protecteur de la sérumalbumine humaine et de la cystéine,

3 - l'effet activateur des sels ferreux ; leur action est confirmée par l'effet inhibiteur de l'éthylène diamine tétraacétate de sodium.

# CHAPITRE III

## ETUDE METABOLIQUE DES PRODUITS DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE.

### I - Incorporation in vivo de l'acide (1-$^{14}$C) azélaïque dans les lipides du rat.

RESULTATS

DISCUSSION

### II - Incorporation in vitro de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque dans les lipides sanguins.

RESULTATS

1 - Incorporation de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque dans les lipides sanguins.

a) expériences sur le sang total
b) expériences sur le plasma
c) expériences sur les hématies.

2 - Cinétique de la réaction.
3 - Mécanisme de la réaction
4 - Nature de la liaison de l'acide nonanal-9-oïque dans les phospholipides.

DISCUSSION

### III - Action de l'acide azélaïque sur la consommation d'oxygène d'homogénats hépatiques.

RESULTATS

DISCUSSION

# CHAPITRE III

## ETUDE METABOLIQUE DES PRODUITS DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE.

Nous envisagerons successivement :

I - l'incorporation in vivo de l'acide (1-$^{14}$C) azélaïque dans les lipides du rat.

II - l'incorporation in vitro de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque dans les lipides sanguins.

III - l'action de l'acide azélaïque sur la consommation d'oxygène d'homogénats hépatiques.

### I - Incorporation in vivo de l'acide (1-$^{14}$C) azélaïque dans les lipides du rat.

A notre connaissance, les études sur le métabolisme de l'acide azélaïque sont assez anciennes et n'ont porté que sur des animaux recevant dans l'alimentation de l'acide azélaïque en grande quantité. C'est pourquoi nous envisageons d'étudier l'incorporation de l'acide azélaïque quand il est administré à dose traceuse. Comme animal d'expérience, nous avons choisi le rat, car l'urine de ce dernier ne contient pas d'acide azélaïque (177).

RESULTATS

Le tableau XIX rapporte la distribution du $^{14}$C (moyenne de 6 expériences) dans les principaux tissus du rat prélevés 8 heures après intubation d'acide (1-$^{14}$C) azélaïque.

| | Radioactivité en cpm/g tissu. frais | Radioactivité de l'ensemble de l'organe en cpm | Pourcentage de Radioactivité administrée |
|---|---|---|---|
| Foie | 555 | 4 297 | 1,4 |
| Poumons | 3 112 | 4 657 | 1,4 |
| Reins | 5 547 | 9 952 | 3,0 |
| Epididyme | 400 | 500 | 0,14 |
| Urine | 30 700 | 37 050 | 11,4 |
| Globules | 41 000 | 266 500* | 82,0 |
| Plasma | 210 | 1 365* | 0,4 |

TABLEAU XIX - Répartition tissulaire de la radioactivité chez le rat après intubation stomacale de (1-$^{14}$C) acide azélaïque.

* La radioactivité sanguine est évaluée en considérant que les rats utilisés ont un volume sanguin de 13 ml (moyenne de la masse sanguine pour un rat de 250 g).

La quasi totalité de l'acide (1-$^{14}$C) azélaïque ingérée est retrouvée dans l'ensemble des tissus étudiés sans élimination de $^{14}CO_2$. 11,4 % de la radioactivité administrée sont éliminés dans les urines. L'analyse chromatographique de celles-ci montre deux spots distincts,dont l'un correspond au témoin d'acide azélaïque (figure 20). Ces deux spots sont grattés, élués et chromatographiés à nouveau dans le solvant des diacides. La révélation montre deux taches de même Rf,colorées par la ninhydrine, non colorées par le réactif de Zinzadze et qui,en chromatographie en phase gazeuse,ont le même temps de rétention que l'acide azélaïque. Il s'agit donc d'acide azélaïque libre ou lié aux acides aminés urinaires (composés 1 et 2 de la figure 21).

Les organes prélevés sont peu radioactifs. Il faut noter la faible radioactivité du foie et des poumons (1,4 %) 8 heures après l'administration de l'acide azélaïque. L'absence de $^{14}$C dans l'épididyme exclut la mise en réserve d'acide azélaïque dans le tissu adipeux.

La radioactivité sanguine est exclusivement globulaire : 82 % dans les hématies et seulement 0,4 % dans le plasma (figure 22).

L'autoradiographie des dérivés méthylés globulaires montre que l'acide azélaïque n'est pas transformé, en particulier en acides monocarboxyliques ; l'absence d'esters méthyliques en est la preuve.

La chromatographie en couche mince des extraits lipidiques globulaires montre :

1 - dans les lipides totaux, une radioactivité prédominante dans les phospholipides (40,7 %) et moins accusée dans les lipides neutres (31,5 %). 27,5 % restent à l'état d'acide azélaïque libre.

2 - dans les phospholipides, essentiellement un marquage des lécithines et des céphalines.

Le tableau XX rapporte l'incorporation de l'acide (1-$^{14}$C) azélaïque dans les lipides globulaires.

| | Pourcentages de radioactivité $^{14}$C (par rapport à la radioactivité lipidique totale) |
|---|---|
| Phospholipides | |
| Céphalines | 16,4 |
| Lécithines | 15,8 |
| Sphingomyélines | 6,3 |
| Lysolécithines | 2,2 |
| Glycérides | 31,5 |
| Acide azélaïque libre | 27,5 |

TABLEAU XX - Radioactivité des fractions lipidiques globulaires.

Témoin
Acide azélaïque

Urine

FIGURE 21 - Autoradiogramme des composés urinaires du rat après intubation d'acide (1-$^{14}$C) azélaïque.

Système de solvants : Ethanol 96 %-eau-ammoniaque 25 %
(100 : 12 : 16, v v v).

Durée d'exposition du film : 7 jours.

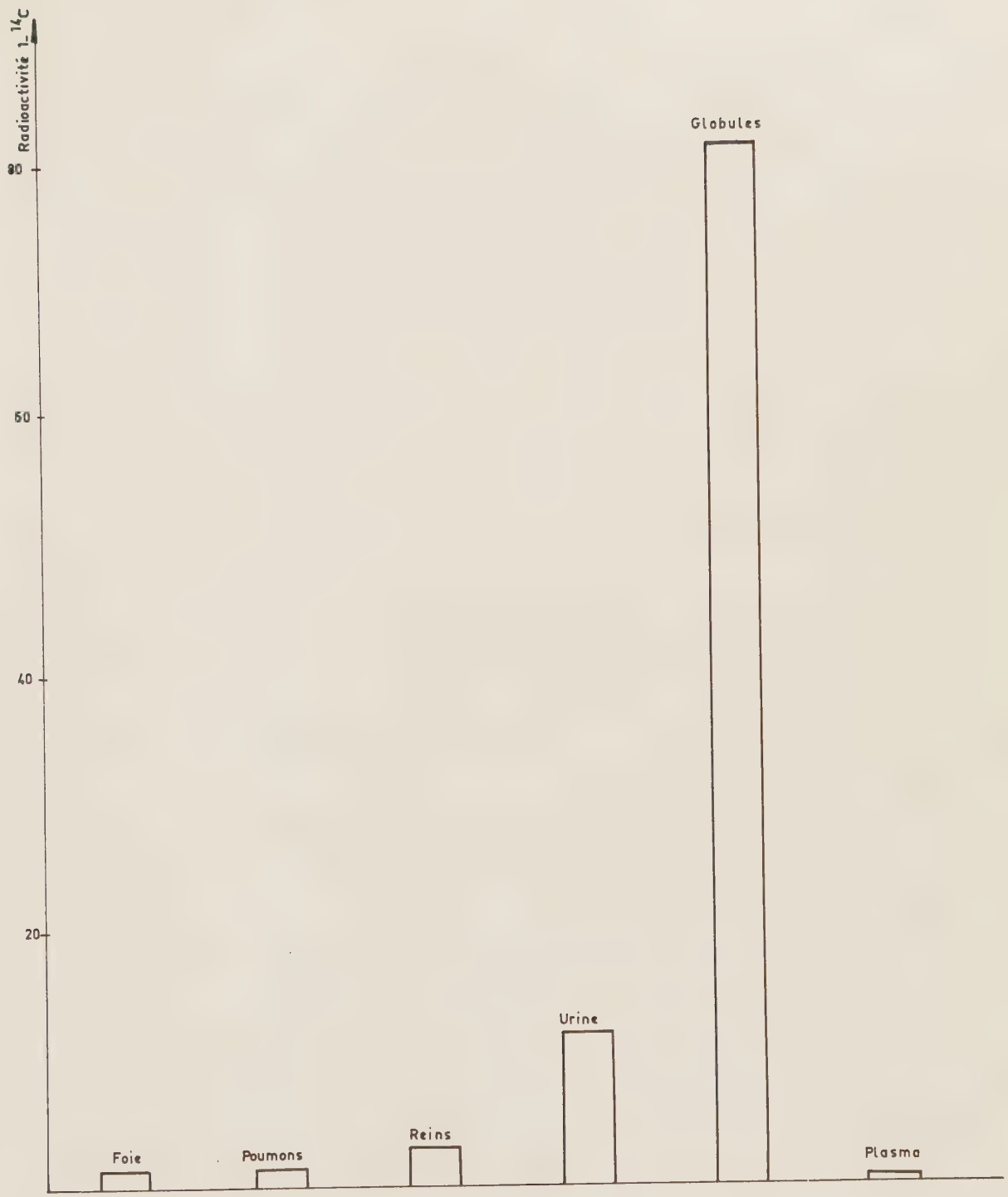



FIGURE 22 - Répartition tissulaire de la radioactivité (exprimée en pourcentage de la radioactivité administrée) après intubation d'acide (1-$^{14}$C) azélaïque.

DISCUSSION

Les résultats obtenus montrent que la totalité de l'acide azélaïque est retrouvée dans l'ensemble des tissus analysés ; ce résultat est différent des valeurs données par les auteurs pour les acides gras longs monocarboxyliques. C'est ainsi que CONIGLIO et Coll. (239) rapportent que 6 à 10 % du (1-$^{14}$C) arachidonate d'éthyle administré à des rats par voie orale à dose traceuse sont oxydés en $^{14}CO_2$ en 6 heures. De plus, COOTS (240) note que 40 % du $^{14}$C (acide arachidonique) administré à des rats dans la nourriture sont excrétés sous forme de $^{14}CO_2$ respiratoire en 51 heures, tandis que, pour l'acide linoléique, le taux passe à 64 % (241). Pour les acides stéarique, oléique, élaïdique et palmitique, ces pourcentages évoluent entre 57,1 % et 70,2 % (242).

L'absence de radioactivité des fèces, opposée à l'excrétion urinaire d'acide azélaïque, est en faveur d'une absorption réelle de cet acide chez le rat et d'une absence de métabolisme. Ces résultats confirment l'absence de β-oxydation des acides gras dicarboxyliques (183) et rappellent les travaux de SMITH (179). En effet, après avoir ajouté de grandes quantités d'acide azélaïque à la nourriture de rats, cet auteur observe l'absence d'acideazélaïque dans les fèces et la présence de 60 % de l'acide ingéré dans les urines.

Comparativement, l'absorption des acides gras monocarboxyliques à longue chaîne, l'acide arachidonique et l'acide linoléique notamment, est également importante (239) (241) (240). Cette dernière, pour l'acide linoléique, ne subit pas de variation selon la géométrie des doubles liaisons (241).

L'acide azélaïque est donc éliminé sans subir de transformation et en particulier de β-oxydation. De plus il est incorporé préférentiellement dans les lipides globulaires où il n'est pas transformé.

La présence d'acide azélaïque dans les globules rappelle un point du métabolisme du malonaldéhyde, produit de peroxydation de certains acides gras insaturés. Le malonaldéhyde, administré dans l'alimentation, est retrouvé surtout dans le sang et particulièrement dans les hématies (172).

La présence prédominante de l'acide azélaïque dans les globules nous a incitée à envisager l'étude de sa cinétique dans les globules rouges du rat.

Les radioactivités lipidiques plasmatiques et globulaires * sont mesurées au compteur à scintillation. La courbe (figure 23) représente les pourcentages des radioactivités plasmatique et globulaire par rapport à la radioactivité totale du sang en fonction du temps qui suit l'intubation.

L'acide azélaïque passe dans les lipides globulaires dès la première heure après l'ingestion de cet acide ; en effet 15 minutes après l'intubation, la radioactivité sanguine est exclusivement plasmatique.

* Les prises de sang sont effectuées par ponction cardiaque sans anesthésie préalable.

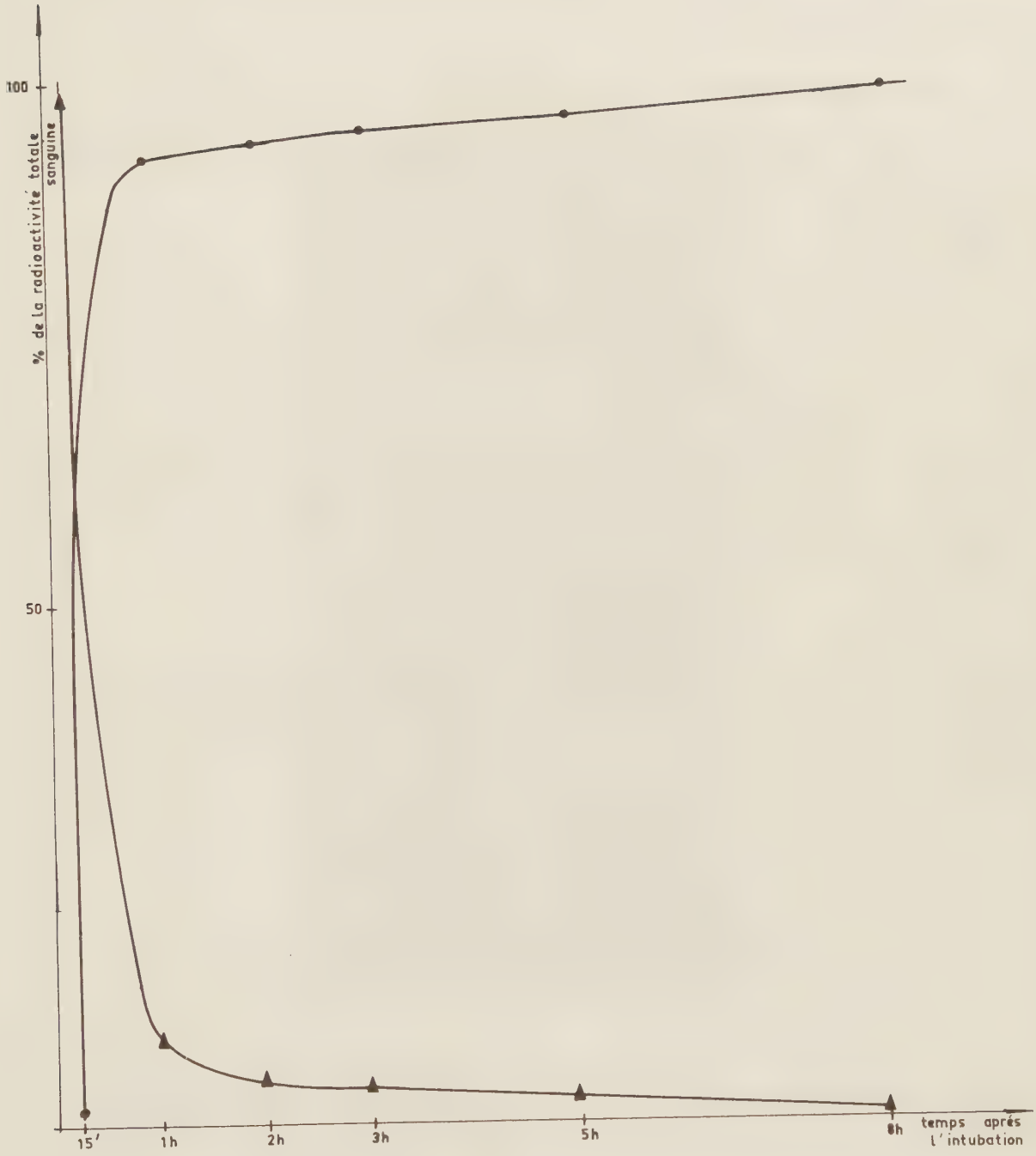



FIGURE 23 - Incorporation de l'acide (1-$^{14}$C) azélaïque en fonction du temps après l'ingestion de l'acide.

●—● radioactivité globulaire.

▲—▲ radioactivité plasmatique.

EN RESUME, 8 heures après son ingestion, l'acide (1-$^{14}$C) azélaïque est entièrement absorbé ; il est éliminé sans être métabolisé. Son incorporation se fait essentièllement dans les lipides globulaires.

II - Incorporation in vitro de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque dans les lipides sanguins.

Nous avons envisagé l'incorporation de cet acide dans le sang humain, comparativement à celle d'un acide gras monocarboxylique, l'acide oléique.

RESULTATS.

Successivement nous rapportons les résultats relatifs :

1 - à l'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans le sang,

2 - à la cinétique de la réaction,

3 - au mécanisme de la réaction,

4 - à la nature de la liaison de l'acide nonanal-9-oïque dans les phospholipides.

1 - Incorporation de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque dans les lipides sanguins.

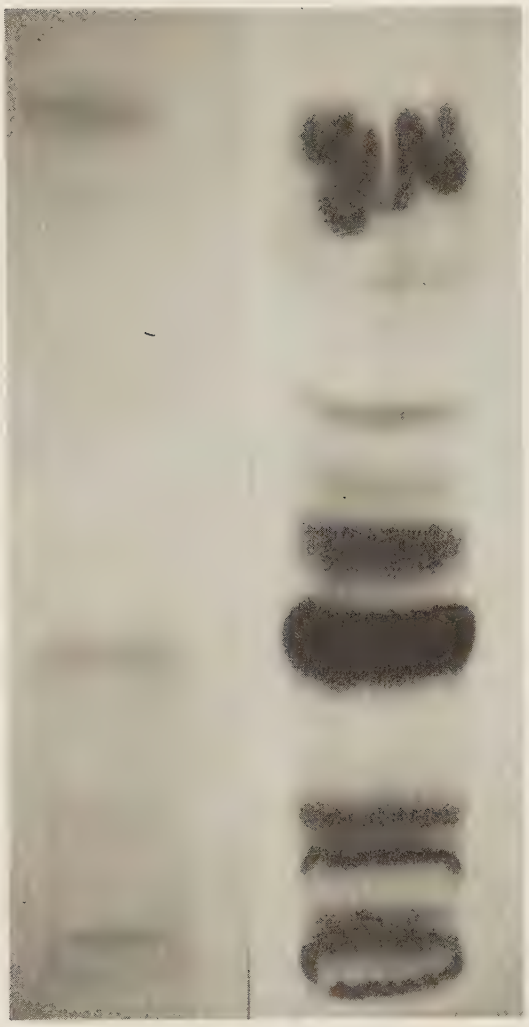
a) Expériences sur le sang total.

Le tableau XXI rapporte la moyenne des résultats de 14 expériences effectuées sur le sang total. L'aldéhydo-acide se localise presque exclusivement dans le plasma (figure 24) ; 50,5 % et 3,1 % du produit incubé avec le sang total sont présents respectivement dans le plasma et dans les hématies.

| | PLASMA | GLOBULES ROUGES |
|---|---|---|
| Phospholipides | 85,6 | 3,7 |
| Lipides neutres | 3,9 | 0,4 |
| Libre | 5,8 | 0,6 |

TABLEAU XXI - Incorporation de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque dans les lipides plasmatiques et globulaires (valeurs exprimées en pourcentage des $^{14}$C lipidiques plasmatique et globulaire).

Dans le plasma, la radioactivité est localisée essentiellement dans les phospholipides (85,6 % du $^{14}$C lipidique sanguin), alors que les lipides neutres sont peu marqués (3,9 %). L'acide nonanal-9-oïque libre migre en front du solvant. Des résultats semblables sont obtenus en remplaçant, dans le sang, le plasma par 0,5 ml d'une solution de sérum physiologique contenant 26 mg de serum albumine, quantité correspondante au taux de sérum albumine plasmatique.



Acide nonanal-9-oïque

Phosphatidalcholines (PC)

I II

FIGURE 24 - Autoradiogramme des chromatographies en couche mince des lipides globulaires (I) et des lipides plasmatiques (II) après incubation avec l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque.

Système de solvants : chloroforme-méthanol-ammoniaque 7 N (76 : 30 : 5, v/v/v)

Durée d'exposition du film : 15 jours.

L'électrophorèse du plasma sur bande d'acétate de cellulose montre le marquage très intense des albumines plasmatiques (figure 25). 85 % (moyenne de 6 analyses électrophorètiques) de la radioactivité plasmatique sont localisés au niveau des sérum albumines.

Le tableau XXII résume les pourcentages de radioactivité des préalbumines et des albumines, obtenues après électrophorèse sur gel de polyacrylamide. 89,2 % de la radioactivité plasmatique siègent dans les sérum albumines (59,8 % dans les préalbumines contre 29,4 dans les albumines).

| | |
|---|---|
| Préalbumines | 59,8 (53,8 - 67,4) |
| Albumines | 29 4 (23,9 - 33,8) |
| Autres fractions protéiques | 10,8 ( 8,7 - 12,9) |
| Somme préalbumines-albumines | 89,2 (87,1 - 91,3) |

TABLEAU XXII - Répartition de la radioactivité plasmatique sur électrophorèse de gel de polyacrylamide après incubation de sang total avec l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque.

Ces valeurs représentent la moyenne de 5 expériences ; les valeurs extrêmes sont indiquées entre parenthèses.

Ce chiffre est par ailleurs confirmé par les résultats donnés par la précipitation des sérum-globulines par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

La récupération des albumines, leur extraction lipidique, suivies de leur dépôt chromatographique, révèlent, après autoradiographie, un marquage analogue à celui obtenu avec la totalité du plasma (figure 24).

Les albumines plasmatiques transportent donc, outre l'acide nonanal-9-oïque, les phospholipides à acide nonanal-9-oïque.

Le tableau XXIII montre que l'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans les lipides sanguins ne nécessite pas la présence de CoA et d'ATP (moyenne de 2 expériences).

| | Avec ATP et CoA | | Sans ATP | | Sans CoA | | Sans ATP et CoA | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Plasma | Hématies | Plasma | Hématies | Plasma | Hématies | Plasma | Hématies |
| Phospholipides | 84,3 | 1,1 | 84,4 | 0,9 | 84,6 | 0,8 | 86,1 | 1,0 |
| Lipides neutres | 2,8 | 0,8 | 3,1 | 0,2 | 2,3 | 0,3 | 2,0 | 0,4 |
| Libre | 9,8 | 1,3 | 10,2 | 1,2 | 10 8 | 1,4 | 8,7 | 1,8 |

TABLEAU XXIII - Influence de l'ATP et du CoA sur l'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans les lipides plasmatiques et globulaires (valeurs exprimées en pourcentage des $^{14}$C lipidiques plasmatique et globulaire).

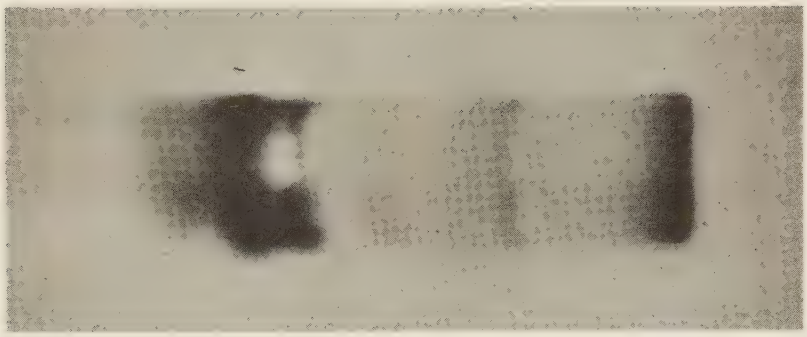


FIGURE 25 - Autoradiogramme de l'électrophorèse du plasma après incubation avec l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque.
Support : acétate de cellulose ; tampon : véronal-véronal sodique pH 8,6 ; tension : 180 volts ; durée : 1 H 15.
Durée d'exposition du film : 15 jours.

Comparativement, pour l'acide oléique (figure 26) la plus grande partie de la radioactivité (83,6 % du $^{14}C$ lipidique sanguin) reste sous forme libre dans le plasma, alors que 10,3 % du $^{14}C$ lipidique sanguin ont pénétré dans l'hématie et 8 % ont été incorporés dans les lipides (tableauXXIV), (moyenne de 3 expériences).

| | PLASMA | GLOBULES ROUGES |
|---|---|---|
| Phospholipides | 2,5 | 4,6 |
| Lipides neutres | 1,7 | 3,4 |
| Libre | 85,6 | 2,9 |

TABLEAU XXIV - Incorporation de l'acide (1-$^{14}C$) oléique dans les lipides plasmatiques et globulaires (valeurs exprimées en pourcentage des $^{14}C$ lipidiques plasmatique et globulaire).

Les électrophorèses du plasma après incubation de sang avec l'acide (1-$^{14}C$) oléique montrent que la quasi totalité de la radioactivité est localisée au niveau des sérumalbumines (90 %).

Le tableau XXV comparatif de l'incorporation des acides nonanal-9-oïque et oléique dans les lipides sanguins résume les divergences observées dans leur comportement in vitro.

| | ACIDE NONANAL-9-OIQUE | | ACIDE OLEIQUE | |
|---|---|---|---|---|
| | PLASMA | GLOBULES | PLASMA | GLOBULES |
| Phospholipides | 45,4 | 2,1 | 2,3 | 1,5 |
| Lipides neutres | 2,1 | 0,2 | 1,5 | 1,3 |
| Libre | 3,0 | 0,8 | 81,7 | 0,9 |

TABLEAU XXV - Distribution des radioactivités plasmatiques et globulaires dans le cas d'incorporation d'acide (1-$^{14}C$) nonanal-9-oïque et d'acide (1-$^{14}C$) oléique (valeurs exprimées en pourcentage du $^{14}C$ incubé).

b) Expériences sur le plasma.

Des expériences semblables effectuées avec du plasma seul ont montré une incorporation prépondérante de l'acide nonanal-9-oïque dans les phospholipides plasmatiques (figure 27). Cependant une moins grande proportion d'acide nonanal-9-oïque est incorporée. L'acide oléique, dans les mêmes conditions, n'est pas incorporé.

FIGURE 26 - Autoradiogramme des chromatographies en couche mince des lipides globulaires (I) et des lipides plasmatiques (II) après incubation avec l'acide (1-$^{14}$C) oléique.

Système de solvants : Chloroforme-méthanol-eau-acide acétique (60 : 30 : 6 : 1, v/v/v/v).

Durée d'exposition du film : 10 jours.

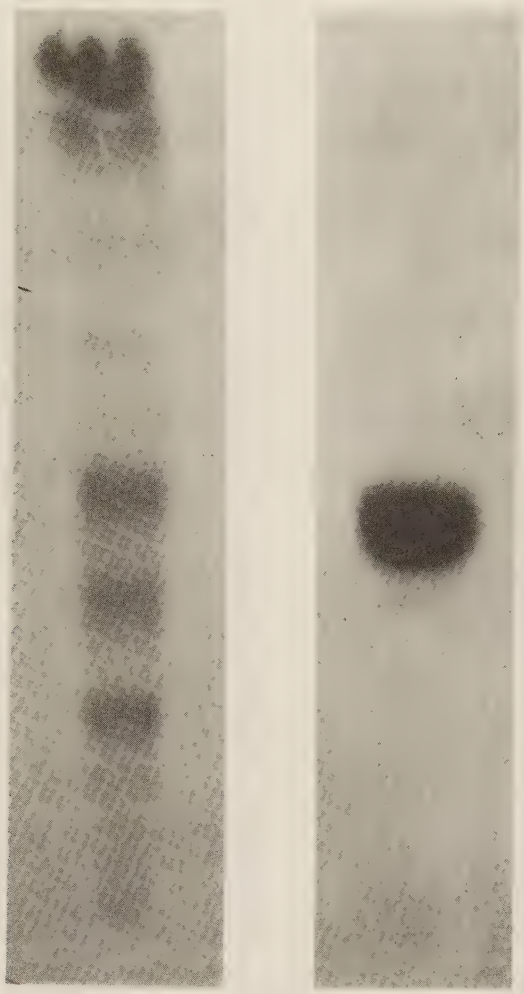



FIGURE 27 - Autoradiogramme des chromatographies en couche mince des lipides plasmatiques après incubation avec l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque (I) et avec l'acide (1-$^{14}$C) oléique (II)

Système de solvants : chloroforme-méthanol-ammoniaque 7 N (76 : 30 : 5, v/v/v).

Durée d'exposition du film : 11 jours.

Le tableau XXVI représente les moyennes de 4 expériences.

| | ACIDE NONANAL-9-OIQUE | ACIDE OLEIQUE |
|---|---|---|
| Phospholipides | 14 286 | 450 |
| Lipides neutres | 2 007 | 290 |
| Libre | 21 660 | 38 600 |

TABLEAU XXVI - Incorporation des acides (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque et (1-$^{14}$C) oléique dans les lipides plasmatiques (valeurs exprimées en cpm).

c) Expériences sur les hématies.

Des incubations avec des hématies seules débarrassées de leucocytes corroborent les résultats obtenus avec le sang total : nette incorporation de l'acide oléique et quasi absence de fixation de l'acide nonanal-9-oïque dans les lipides globulaires (figure 28).

Dans le tableau XXVII, sont résumées les moyennes obtenues à partir de 5 expériences, comparativement pour l'acide nonanal-9-oïque et pour l'acide oléique.

| | ACIDE NONANAL-9-OIQUE | ACIDE OLEIQUE |
|---|---|---|
| Phospholipides | 607 | 20 255 |
| Lipides neutres | 258 | 1 266 |
| Libre | 750 | 20 000 |

TABLEAU XXVII - Incorporation des acides (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque et (1-$^{14}$C) oléique dans les lipides globulaires (valeurs exprimées en cpm).

2 - Cinétique de la réaction.

Nous avons étudié l'incorporation de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque au cours de la première heure d'incubation, car des expériences nous ont montré que cette incorporation dans le sang est quasi stable lorsque le temps d'incubation dépasse 1 heure.

Sur la figure 29, sont représentées les variations comparées de l'acide nonanal-9-oïque libre et de l'acide nonanal-9-oïque incorporé dans les lipides sanguins en fonction du temps d'incubation. Une première constatation s'impose : l'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans le sang augmente très peu au-delà de la dixième minute.

Au temps zéro, 84,6 % de l'acide nonanal-9-oïque restent à l'état libre, alors que 11,8 % sont fixés dans le principal phospholipide. Au bout de 10 minutes, 60 % de l'acide nonanal-9-oïque s'incorporent dans les phospholipides sanguins, alors que la fraction libre s'abaisse à 37,9 %.

La vitesse de la réaction, constante pendant les dix premières minutes, diminue ensuite et devient très faible.

FIGURE 28 - Autoradiogramme des chromatographies en couche mince des lipides globulaires après incubation avec l'acide (1-$^{14}$C) oléique (I) et avec l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque (II).

Système de solvants : chloroforme-méthanol-ammoniaque 7 N (76 : 30 : 5, v/v/v).

Durée d'exposition du film : 14 jours.

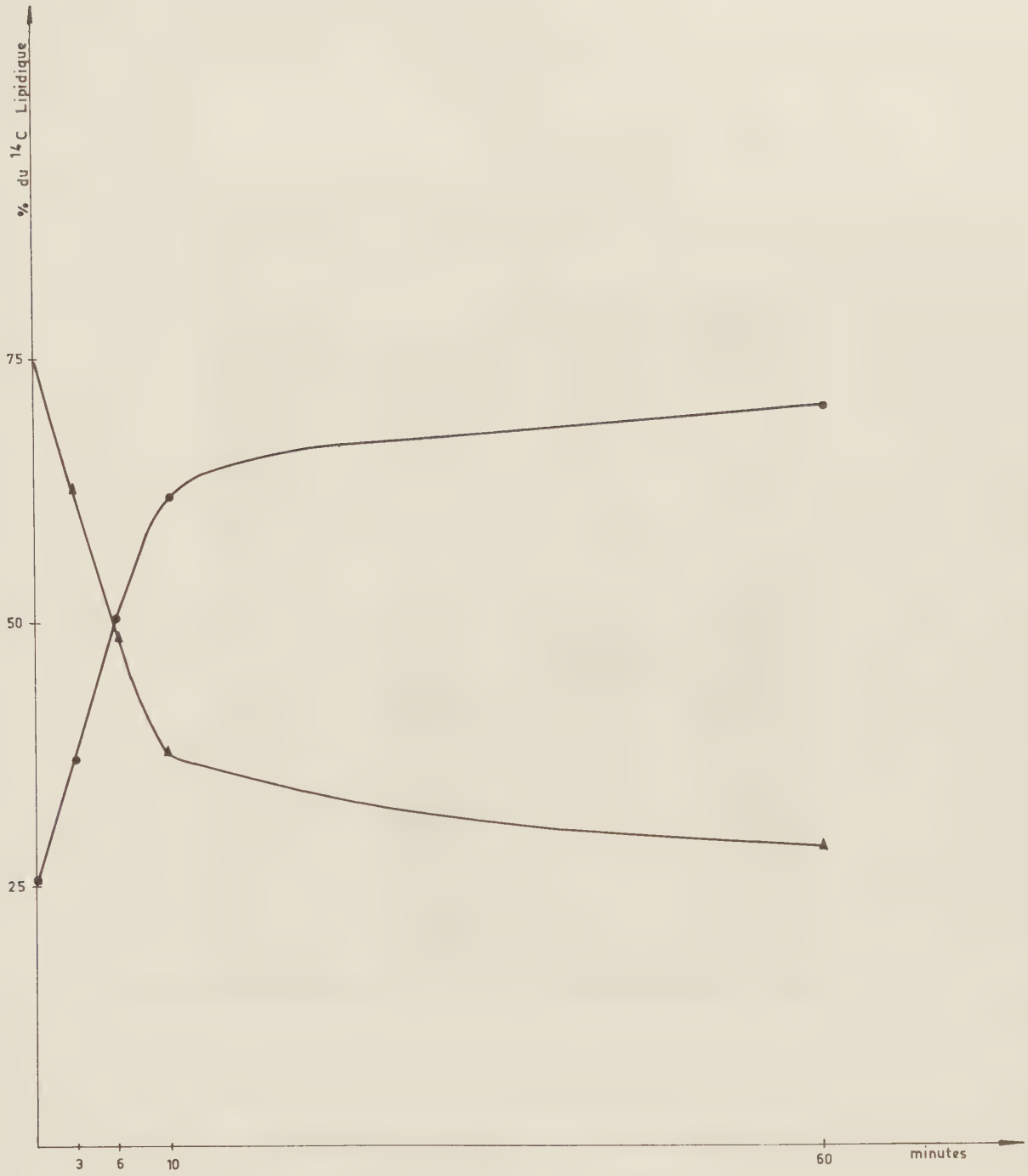



FIGURE 29 - Incorporation de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque en fonction du temps d'incubation.

●—● acide nonanal-9-oïque incorporé ;

▲—▲ acide nonanal-9-oïque libre.

Ces résultats montrent que l'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans le sang est un phénomène rapide.

3 - Mécanisme de la réaction.

Afin d'élucider la nature du mécanisme d'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans les lipides sanguins, nous avons envisagé l'influence de la chaleur sur cette incorporation.

L'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque est étudiée dans le plasma et dans le sang préalablement portés à l'ébullition pendant 1 heure (figure 30 A et B).

Comparativement aux échantillons non bouillis, le taux d'acide nonanal-9-oïque libre passe de 54,1 % dans le plasma non porté à ébullition à 75,0 % dans le plasma bouilli, alors que,dans le sang total,de 28,6 % il s'élève à 80 % dans le sang préalablement porté à l'ébullition. Parallèlement, les taux d'acide nonanal-9-oïque incorporé sont respectivement de 45,5 % et de 24,6 % dans le plasma non bouilli et dans le plasma bouilli. Dans le sang non bouilli et dans le sang bouilli, ces taux sont respectivement de 71 % et de 19,7 %.

Comme le montre l'histogramme de la figure 31, l'inhibition,par le chauffage à 100°,du sang total permet d'admettre une intervention enzymatique globulaire. A cette intervention enzymatique globulaire, il faut ajouter une réactivité chimique importante de l'acide nonanal-9-oïque au niveau du plasma.

Des expériences comparatives effectuées avec l'acide (1-$^{14}$C) oléique révèlent que celui-ci reste quasi totalement sous forme libre dans les globules rouges portés à ébullition. (96,9 % après ébullition contre 80 % dans les échantillons témoins). Ce taux important d'acide libre est dû à l'absence de centrifugation du milieu après l'incubation.

Son taux d'incorporation dans les lécithines, principal lieu d'incorporation des acides gras monocarboxyliques, est de 8,2 % dans les globules rouges non bouillis contre 1,6 % après ébullition.

4 - Nature de la liaison de l'acide nonanal-9-oïque dans les phospholipides.

La nature de l'acide nonanal-9-oïque implique deux modes de liaison possible : acétal ou ester.

Pour élucider ce problème, nous avons fait appel à quatre procédés :

- l'action de la phospholipase A de venin de serpent,qui classiquement hydrolyse les liaisons esters sur le carbone 2 des phospholipides et laisse intactes les liaisons acétals,

- l'hydrolyse alcaline ménagée, qui préserve les liaisons acétals et atteint seulement les liaisons esters,

- l'hydrolyse acide en présence de HgCl2 , qui hydrolyse toutes les liaisons,

- l'action de la p-nitrophénylhydrazine qui agit sélectivement sur les groupements aldéhydiques.

FIGURE 30 - Autoradiogramme des chromatographies en couche mince des lipides plasmatiques (A) et des lipides sanguins totaux (B) après incubation avec l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque.

1, échantillon bouilli ; 2, échantillon non bouilli.

Système de solvants : chloroforme-méthanol-ammoniaque 7N (76 : 30 : 5, v/v/v).

Durée d'exposition du film : 13 jours.

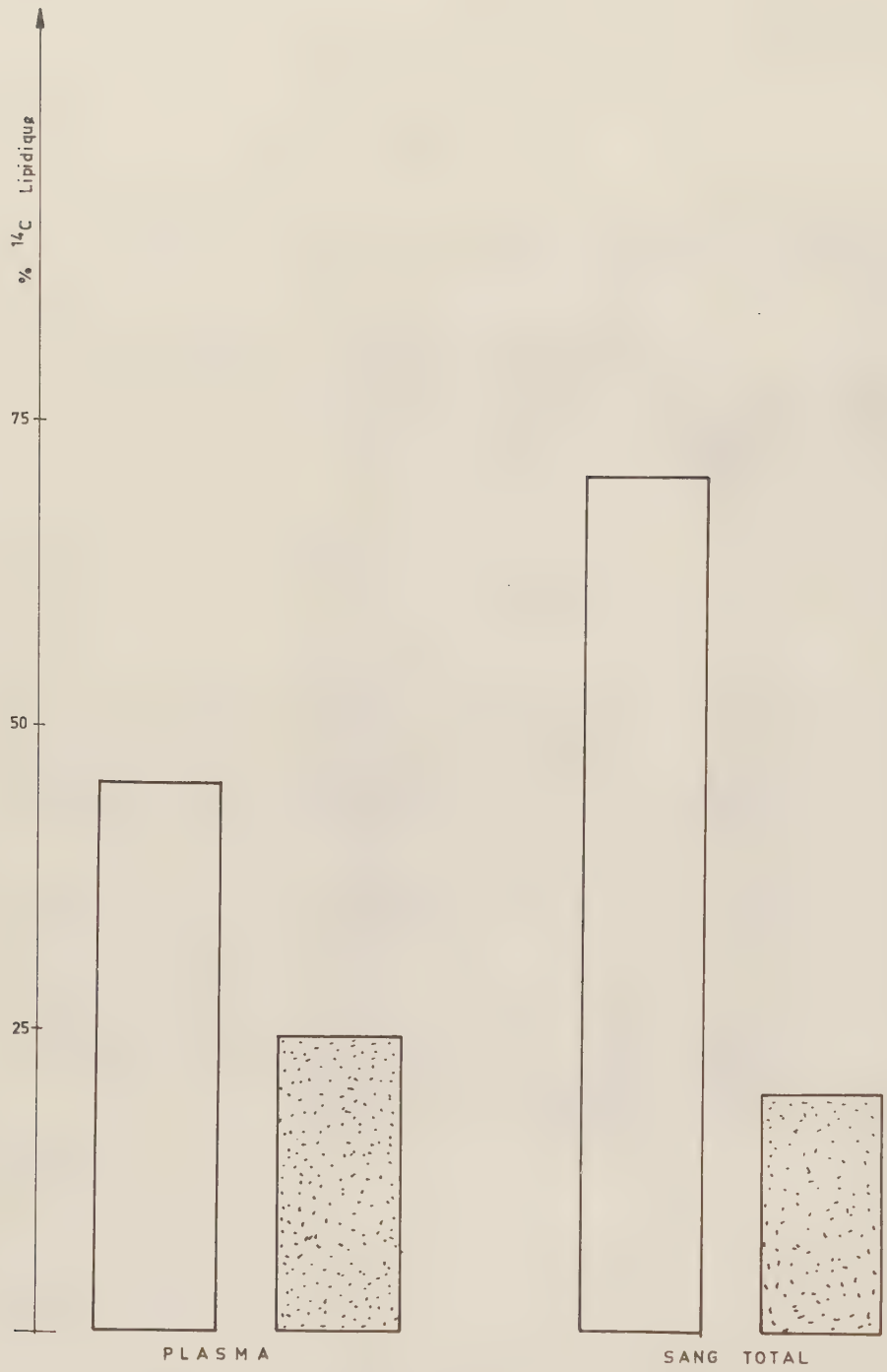



FIGURE 31 - Influence de la chaleur sur l'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans le sang et dans le plasma.

Echantillon non soumis à l'ébullition ;

Echantillon soumis à l'ébullition pendant 1 heure.

L'action de la phospholipase A sur le principal phospholipide (PC) (voir figure 24), après incorporation d'acide nonanal-9-oïque, s'accompagne de la persistance de la radioactivité au niveau de ce phospholipide et de l'absence de radioactivité dans le lysodérivé et dans l'acide nonanal-9-oïque ( figure 32).

L'absence d'une action phospholipasique permet d'écarter l'éventualité d'une liaison ester en 2 (Tableau XXVIII).

| | Radioactivité $^{14}C$ (cpm) dans | | |
|---|---|---|---|
| | Phospholipide | Acide nonanal-9-oïque | Lysophospholipide |
| Essai | 718 (658-780) | 10 (4-18) | 24 (10-40) |
| Témoin | 711 (681-760) | 8 (7-20) | 15 (12-37) |

TABLEAU XXVIII - Action de la phospholipase A

Les valeurs indiquées représentent les moyennes obtenues à partir de 4 expériences ; les valeurs extrêmes sont indiquées entre parenthèses.

L'hydrolyse alcaline ménagée du composé phospholipidique (PC) ne modifie pas la migration chromatographique. Par contre, l'hydrolyse acide entraîne une dégradation partielle de la molécule phospholipidique ; l'autoradiographie nous permet de mettre en évidence la libération d'acide nonanal-9-oïque, malgré la persistance d'une partie de la radioactivité au niveau du phospholipide initial.

Dans la molécule phospholipidique, la présence de groupement CHO libre est infirmée par l'absence d'action de la p-nitrophénylhydrazine.

L'étude conjuguée de la phospholipase A, des résultats d'hydrolyse ménagée et de la p-nitrophénylhydrazine suggère que l'acide nonanal-9-oïque s'incorpore dans les phospholipides par acétalisation dans les deux positions du glycérophosphoryldérivé, le groupement carboxylique demeurant libre.

DISCUSSION

Dans la discussion, nous reprenons les divers points envisagés dans les résultats.

Successivement nous nous intéressons à :

- l'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans les lipides sanguins,
- la cinétique de cette incubation,
- l'influence de l'ébullition,
- la position occupée par l'acide nonanal-9-oïque dans les molécules de phospholipide.

FIGURE 32 - Action de la phospholipase A sur le phospholipide (PC) à acide nonanal-9-oïque.

I, échantillon essai ; II, échantillon témoin ;
PC, phosphatidalcholine.
Système de solvants : chloroforme-méthanol-ammoniaque 7 N (76 : 30 : 5, v/v/v).
Durée d'exposition du film : 25 jours.

L'incubation de sang en présence de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque s'accompagne d'une incorporation prépondérante dans les phospholipides plasmatiques.

Contrairement à l'acide oléique, cet aldéhydo-acide s'incorpore notablement dans le plasma sous forme de phospholipides. Nous n'avons pu identifier avec certitude les différentes taches de phospholipides ; cependant, différents arguments nous incitent à attribuer au principal composé la nature des phosphatidal-cholines (figure 24) ; leur Rf est légèrement supérieur à celui des esters correspondants (243), l'étude des produits d'hydrolyse ménagée conjuguée à l'action phospholipasique élimine la possibilité de liaisons esters.

Le milieu d'incubation que nous avons adopté est un milieu hyperosmotique (771 µosmoles par millilitre). Des résultats semblables sont obtenus après incubation du sang dans un milieu isotonique.

Les électrophorèses plasmatiques montrent dans le cas de l'acide nonanal-9-oïque le transport des phospholipides par les sérumalbumines.

Quelles raisons peut-on invoquer à un tel mécanisme ?

Nous avons vu que l'acide nonanal-9-oïque a son groupement carboxylique qui est libre dans la molécule de phospholipide, ce fait peut permettre d'expliquer le transport des phospholipides à acide nonanal-9-oïque par les sérumalbumines.

De plus nous avons pu noter la perte de radioactivité des albumines lorsque les électrophorèses, soit sur acétate de cellulose, soit sur gel de polyacrylamide, sont révélées avant leur autoradiographie. Ceci peut être expliqué par l'utilisation de solvants polaires, tels que le mélange méthanol, acide acétique et eau.

Par ailleurs, nous avons observé une certaine diffusion des composés radioactifs, alors qu'ils ne sont pas fixés après électrophorèse par les solutions acétiques. Ce fait a pu être observé avec l'acide (1-$^{14}$C) oléique en comparant les résultats obtenus avec des électrophorèses sur gel de polyacrylamide colorées et non colorées.

L'utilisation du solvant acide des phospholipides, soit en monodimension, soit en bidimension, n'a donné aucun résultat satisfaisant ; en effet les composés à acide nonanal-9-oïque sont mal séparés et migrent tous au front de l'acide acétique.

L'incubation de plasma seul dans les mêmes conditions s'accompagne de l'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans les phospholipides plasmatiques, contrairement à l'acide oléique qui reste entièrement sous forme libre.

MULDER et VAN DEENEN (244), WINTERBOURN et BATT (245) ont signalé ce phénomène de non incorporation des acides gras monocarboxyliques en l'absence de globules rouges et ont exclu la possibilité que les phospholipides globulaires proviennent du sérum.

Contrairement à l'incorporation des acides gras monocarboxyliques dans les globules rouges (246)(247) (244), celle de l'acide nonanal-9-oïque ne nécessite ni la présence d'ATP ni celle de CoA.

Nous avons montré que l'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans le sang est un phénomène rapide, puisque, après 10 minutes d'incubation, 60 % de cet acide sont incorporés dans les phospholipides. Au contraire, OLIVEIRA et VAUGHAN (247), MULDER et VAN DEENEN (244) mentionnent que l'incorporation des acides palmitique et linoléique dans les globules rouges est un processus lent. MULDER, DE GIER et VAN DEENEN (248)

notent que l'acide linoléique se répartit d'une manière semblable dans les phospholipides globulaires après des périodes d'incubation allant de 30' à 6 h.

L'incubation de l'acide nonanal-9-oïque dans le sang porté à l'ébullition pendant 1 heure est suivie d'une diminution intense de son incorporation dans les phospholipides, alors que dans le plasma la différence est peu marquée. Ces résultats montrent que l'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans le sang dépend d'un système enzymatique globulaire. Ce résultat est à rapprocher de l'absence d'incorporation de l'acide palmitique dans les globules rouges portés à ébullition (247).

A cette intervention enzymatique globulaire, il faut toutefois ajouter une réactivité chimique importante de l'acide nonanal-9-oïque au niveau du plasma, comme le prouvent les résultats observés au temps zéro. Nous avons, par ailleurs, signalé que l'acide nonanal-9-oïque est presque exclusivement fixé dans les lipides plasmatiques. Comment peut-on alors interpréter ce phénomène ?

Le plasma pourrait intervenir par ses albumines, qui transportent les phospholipides à acide nonanal-9-oïque, comme le prouvent les électrophorègrammes.

L'étude conjuguée de la phospholipase A, des hydrolyses et de l'action de la p-nitrophénylhydrazine suggère que l'acide nonanal-9-oïque s'incorpore dans les phospholipides par acétalisation dans les deux positions du glycérophosphoryl dérivé, le groupement carboxylique demeurant libre. Cette acétalisation peut de plus être en relation avec la présence non nécessaire de CoA et d'ATP dans le milieu d'incubation.

Un tel composé présentant une chaîne courte sur le carbone 2 rappelle la formation de 1-acyl, 2-succinyl-glycérophosphorylcholine (249) ; cette fixation de l'acide succinique en position 2 est par ailleurs mise en évidence par l'action de la phospholipase A.

EN RESUME, l'étude de l'incorporation des acides oléique et nonanal-9-oïque dans les lipides sanguins nous amène à comparer leur métabolisme in vitro. L'acide oléique est à prédominance globulaire, tandis que l'acide nonanal-9-oïque est à prédominance plasmatique.

L'acide nonanal-9-oïque s'incorpore préférentiellement dans les phospholipides plasmatiques ; par contre l'acide oléique s'intègre à la fois dans les phospholipides et dans les lipides neutres des globules.

L'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque s'effectue dans les dix premières minutes et dépend d'un système enzymatique globulaire. Elle n'a pas lieu en l'absence de plasma qui semble intervenir par un mécanisme non enzymatique.

Dans le plasma, les phospholipides à acide nonanal-9-oïque sont véhiculés par l'ensemble des sérumalbumines.

III - Action de l'acide azélaïque sur la consommation d'oxygène d'homogénats hépatiques.

Les effets des acides gras à longue chaîne sur la respiration cellulaire sont connus. L'oxydation des acides gras utilisés à très faible concentration ou en présence de sérumalbumine, est suivie de la formation d'ATP (250). De même, sous forme d'acyl-carnitine, les acides gras sont de bons substrats respiratoires, (251). D'après HIRD et WEIDEMANN (250), l'addition de carnitine au mélange d'incubation faciliterait le transport aux mitochondries des acides gras de toute longueur de chaîne.

A l'opposé, ils peuvent être également de puissants agents découplants de la phosphorylation oxydative allant même jusqu'à l'inhibition de la consommation d'oxygène, lorsqu'ils sont présents en plus grande concentration (252) (253) (250). Cette action serait due aux caractères physiques des acides gras (254) ; en effet ceux-ci présentent des propriétés tensioactives qui sont en relation avec la longueur de leur chaîne et avec leur degré d'insaturation.

De plus, on sait que les acides gras obtenus à partir de foie de lapins irradiés par les rayons X ont une action plus énergique sur le gonflement mitochondrial que ceux qui proviennent de lapins non irradiés (255).

Ces données nous ont incitée à suivre la consommation d'oxygène d'un tissu en présence de l'acide azélaïque, produit de la peroxydation de certains acides gras insaturés.

L'étude de la consommation d'oxygène en présence de glucose et de cofacteurs est entreprise parallèlement pour les acides azélaïque et pélargonique, afin de comparer leur action sur la respiration et de connaître le rôle éventuel du deuxième groupement carboxylique de la molécule d'acide azélaïque.

RESULTATS

La consommation d'oxygène est étudiée dans trois séries d'expériences conduites parallèlement :

- en présence d'acide monocarboxylique,
- en présence d'acide dicarboxylique de même longueur de chaîne,
- en l'absence de tout acide gras, afin de connaître la consommation d'oxygène de témoins.

L'expression des résultats se réfère comparativement aux $Q_{O_2}$ ($\frac{\mu l \text{ d'} O_2 \text{ consommé}}{mg \text{ protéines x } t}$).

Le tableau XXIX montre que le taux de la respiration est diminué en présence des acides azélaïque et pélargonique, puisque le $Q_{O_2}$ passe de 7,5 en l'absence d'acide à 5,6 et 4,5 en présence respectivement de l'acide azélaïque et de l'acide pélargonique.

| | $Q_{O_2}$ $\mu l\ O_2/mg$ protéines/h |
|---|---|
| Témoin | 7,5 |
| Acide azélaïque | 5,6 |
| Acide pélargonique | 4,5 |

TABLEAU XXIX - Taux d'oxydation d'un homogénat hépatique en présence des acides monocarboxylique et dicarboxylique (30$\mu$M).

Sur la figure 33, représentative de 7 séries d'expériences, comprenant pour chaque échantillon 2 à 3 essais, est schématisée la consommation d'oxygène, exprimée en micromoles, en fonction du temps comparativement dans les témoins et dans les essais.

En présence des acides pélargonique et azélaïque, la consommation d'oxygène diminue en moyenne respectivement de 39,7 % et de 31,8 % au bout d'une heure d'incubation (figure 34).

Ces résultats montrent que l'action inhibitrice de l'acide azélaïque est comparable à celle de l'acide pélargonique, mais elle s'exerce à un moindre degré.

Les mesures de pH effectuées en fin de réaction ont donné un pH voisin de 7, qui varie de 7,1, pour les échantillons témoins, à 6,80 et 6,90 pour les essais contenant respectivement l'acide azélaïque et l'acide pélargonique.

DISCUSSION

L'action de l'acide azélaïque sur la respiration cellulaire est moins rapide et moins accusée que celle exercée par l'acide pélargonique, acide monocarboxylique de même longueur de chaîne.

Ces différences pourraient être rapprochées de l'action de ces acides gras sur la tension superficielle. Leurs mesures montrent que l'acide pélargonique est beaucoup plus tensioactif que ne l'est l'acide azélaïque (32 dynes/cm contre 56,5 dynes/cm).

De nombreux auteurs (252) (256) (255) ont signalé que les diverses actions des acides gras sur les mitochondries sont maximales pour l'acide myristique. Cette relation entre action mitochondriale et longueur de la chaîne serait partiellement due à l'activité de surface de ces acides gras (255).

L'action des agents de surface est liée à leur possibilité de se combiner aux lipides ou aux protéines de la membrane (255).

En ce qui concerne l'influence du pH, BORST et coll. (253) notent pour l'acide oléique une stimulation de l'activité de l'ATP ase des mitochondries maximale à pH 6,5 et 9 et minimale à pH 7,5-8 ; les acides saturés étudiés : myristique, palmitique, et stéarique manifestent peu d'activité dans la région alcaline. FALCONE et MAO (257) observent un échange maximal des molécules de phosphore dans l'ATP à un pH variant de 6,5 à 7,0, selon la présence ou non de cyanure de potassium.

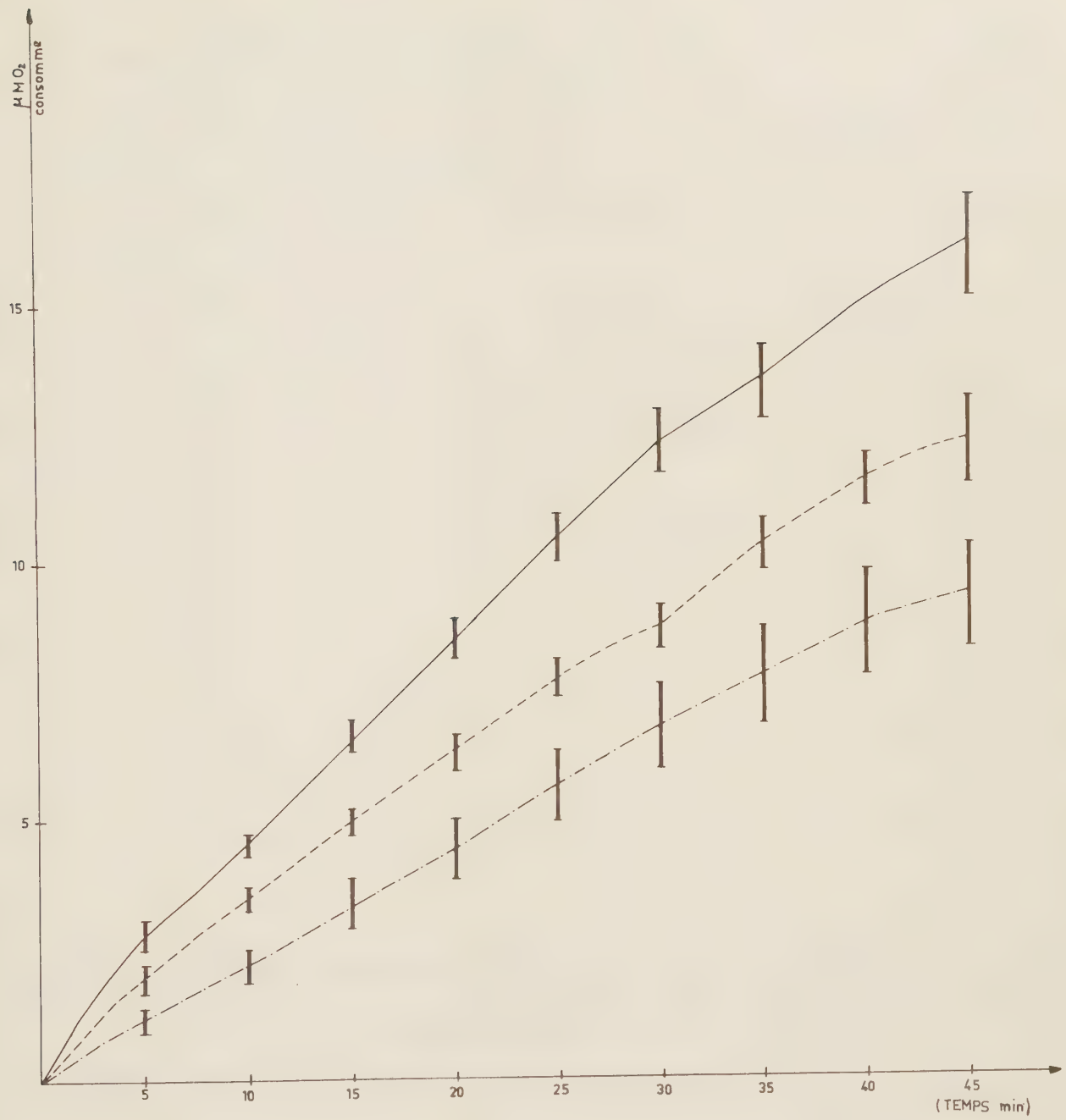



FIGURE 33 - Influence de l'acide azélaïque et de l'acide pélargonique sur la consommation d'oxygène d'homogénats hépatiques. (Valeurs enregistrées dans les 45 premières minutes).

——— témoin,

------ essai avec acide azélaïque,

-.-.- essai avec acide pélargonique.

FIGURE 34 - Variations relatives de la consommation d'oxygène en fonction du temps d'incubation.

C : Consommation d'oxygène de l'essai considéré.

Co : Consommation d'oxygène de l'essai ne contenant pas d'acide.

$\frac{C-Co}{Co}$ = Variation relative de la consommation d'oxygène de l'essai considéré par rapport à la consommation d'oxygène de l'essai sans acide.

■——■ Essai avec acide azélaïque

▲——▲ Essai avec acide pélargonique.

Les résultats que nous avons observés sont relatifs à l'action de 30 µM d'acide azélaïque et d'acide pélargonique sur la consommation d'oxygène.

Cependant AHMED et SCHOLEFIELD (258) mettent en évidence, à la concentration de 30 µM d'acide myristique, une stimulation de la réaction d'échange du phosphore minéral avec l'ATP ; ces résultats sont en opposition avec ceux de FALCONE et MAO (257). WOJTCZAK et coll. (259) présument que l'instabilité de l'acide gras activé et son éventuelle conversion en acide gras non activé aiderait à comprendre l'action découplante des acides gras sur la phosphorylation oxydative.

EN RESUME, l'acide azélaïque, utilisé à la concentration de 30 µM, entraîne une inhibition de la consommation d'oxygène d'un homogénat hépatique de rat. Cette inhibition est cependant moindre que celle exercée par l'acide monocarboxylique de même longueur de chaîne. Il semble donc que le deuxième groupement carboxylique n'exerce pas d'influence supplémentaire sur la respiration cellulaire.

# CONCLUSIONS GENERALES

Les conséquences de l'irradiation sur les êtres vivants nous ont conduite à rechercher une action éventuelle des radiations ionisantes sur les lipides sanguins en général et sur les lipoprotéines plasmatiques en particulier.

Cette étude envisage :

1 - l'action des rayons X sur le sang,

2 - l'action des rayons $\beta$ et des rayons $\gamma$ sur le sang et ses modifications sous l'influence de divers facteurs chimiques,

3 - le devenir des composés formés après irradiation.

1 - Après irradiation des lipoprotéines plasmatiques, nous observons une radiosensibilité très marquée de l'ensemble $\alpha$-lipoprotéines-albumines. L'action des rayons X se manifeste par :

- L'apparition d'une nouvelle fraction lécithinique, différant par la nature des chaines acylées et migrant en chromatographie en couche mince avec les lysolécithines.

- L'élévation du taux de malonaldéhyde, produit formé par peroxydation d'acides gras insaturés.

La nouvelle fraction lécithinique est séparée des lysodérivés par chromatographie en double dimension. La chromatographie en phase gazeuse met en évidence l'apparition de chaines acylées courtes accompagnée de la formation d'un dérivé aldéhydo-acide.

2 - L'incubation de sang en présence d'éléments radioactifs entraine la formation de peroxydes lipidiques.

- Ceux ci sont d'origine exclusivement plasmatique.

- Leur taux croit proportionnellement à la dose de radioactivité jusqu'à une valeur limite et augmente avec la durée d'incubation.

- L'étude de l'influence de certains effecteurs sur la peroxydation lipidique nous permet de confirmer le rôle inhibiteur joué par l'hydroquinone à dose faible, le rôle protecteur de la sérumalbumine humaine et de la cystéine et l'effet activateur des sels ferreux.

3 - Parmi les composés formés par peroxydation consécutive à l'irradiation, nous avons retenu l'acide nonanal-9-oïque et son produit d'oxydation, l'acide azélaique.

In vivo, 8 heures après son ingestion, l'acide azélaïque est entièrement absorbé et éliminé sans transformation. Il est par ailleurs incorporé exclusivement dans les lipides globulaires.

In vitro, l'acide nonanal-9-oïque, dont le métabolisme diffère de celui de l'acide oléique, est à prédominance plasmatique. L'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans les lipides plasmatiques s'effectue dans les dix premières minutes et dépend d'un système enzymatique globulaire. Dans le plasma, les phospholipides à acide nonanal-9-oïque sont véhiculés par les sérumalbumines.

# B I B L I O G R A P H I E


1 - TEOULE R. et CADET J., Action du rayonnement gamma sur la thymine en solution aqueuse et aérée, mesures effectuées à 200 rads. Bull. Soc. Chim. France,1970, 3, 927-932.

2 - LATARJET R., EKERT B., APELGOT S. et REBEYROTTE N., Radiobiochemical studies of deoxyribonucleic acid (DNA). J. Chem. Phys., 1961, 58, 1046-1047.

3 - RIESZ P. et WHITE F.H., Determination of free radicals in gamma irradiated proteins. Nature, 1967, 216, 1208-1210.

4 - PACKER J.E. et WINCHESTER R.V., Radiolysis of neutral aqueous solutions of cysteine in the presence of oxygen. Chem. Comm., 1968, 14, 826.

5 - SCHERZ H., Formation of deoxycompounds and malondialdehyde in irradiated aqueous solutions of carbohydrates and related compounds. Radiat. Res., 1970, 43, 12-24.

6 - REUSCHL H., Action des radiations ionisantes sur l'amidon. Effets des radiations gamma, à la dose de 30 MR, sur l'amidon de pomme de terre en fonction de sa teneur en eau. Thèse Doct. ès Sciences, Paris, 1962.

7 - SHEPPARD C.W. et BURTON V.L., The effects of radioactivity on fatty acids. J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 1636-1639.

8 - MEAD J.F., The irradiation-induced autoxidation of linoleic acid. Science, 1952, 115, 470-472.

9 - CLUBB M.E. et WILLS E.D., The effect of irradiation on unsaturated fatty acids and sulphydryl enzymes. Biochem. J., 1959, 71, 16 P-17 P.

10 - LÜCK H. et KOHN R., Zur bildung mittelkettiger fettsäurereste in elektronenbestrahlten fetten. Experientia, 1961, 17, 109-110.

11 - KITAHARA K., TANAKA Y. et INOUE F., Behavior of unsaturated fatty acids and liquid organic compounds in gamma-ray field. II. Effects of high dose irradiation under electron-beam and Cobalt-60 gamma ray. Yakugaku Zasshi, 1965, 85, 902-905.

12 - DUBRAVCIC M.F. et NAWAR W.W., Radiolysis of lipids : mode of cleavage in simple triglycerides. J. Am. Oil Chemists'Soc., 1968, 45, 656-660.

13 - OHARA S., UTSUMI K. et YAMAMOTO M., The relation between the chemical structure and biochemical properties of unsaturated fatty acids irradiated with the X-ray. Nippon Acta Radiologica., 1963, 23, 491-501.

14 - CASPARINI A.R., CAVINA G., MORETTA G. et QUINTILIANI L.M., Modificazioni dei lipidi emeti nel ratto irradiato in rapporto alleta ed alla dose di raggi X. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1965, 41, 310-312.

15 - KOIKE H. et KOIKE N., Studies on changes in blood lipids induced by roentgen irradiation. Osaka City Med. J., 1965, 11, 175-223.

16 - NOTARIO A., DI MARCO N., DONEDA G., ZANETTI A. et SLAVIERO G., Analisi gaschromatografica degli acidi grassi def fegato di ratti normali ed irradiati. Minerva Nucl., 1965, 9, 237-247.

17 - MEHRAN A.R., LOISELLE J.M. et BLAIS R., Quelques aspects de la biochimie du plasma chez le lapin irradié. Arch. Int. Physiol., 1967, 75, 429-440.

18 - CHUNG R.A., SHAW D.H. et SO E.S., Fatty acid changes in pigeons after lethal-body radiation and bone marrow and thymus administration. Ind. Med. Surg., 1967, 36, 202-204.

19 - BERTI F. et UZARDI M.M., Effetto della radiazioni ionizzanti sulla mobilizzazione degli acidi grassi liberi. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1965, 41, 392-395.

20 - LEVITSKII A.P., Free fatty acid level in blood serum of rats after X-irradiation. Radiobiologiya, 1968, 8, 923-924. (in C.A. 1969, 70 74 906 s).

21 - WINKLER L., Veränderungen der freien Fettsäuren im fruchtwasser, foetalen und mütterlichen blutplasma der ratte nach einer ganzkörper-röntgenbestrahlung mit 800 R. Acta Biol. Med. German., 1966, 17, 186-192.

22 - NOTARIO A., SLAVIERO G.E., DI MARCO N. et BOBBIO-PALLAVICINI E., Modificazioni degli acidi grassi plasmatici nell'uomo dopo trattamento prolungato con raggi roentgen. Minerva Fisiconucl., 1966, 10, 18-26.

23 - NIMS L.F. et SUTTON E., Adrenal cholesterol, liver glycogen and water consumption of fasting and irradiated rats. Am. J. Physiol., 1954, 177, 51-54.

24 - GOULD R.G., BELLAND V.L. et LILLY E.H., Stimulation of cholesterol biosynthesis from acetate in rat liver and adrenals by whole-body irradiation. Am. J. Physiol., 1959, 196, 1231-1237.

25 -SHELLEY R.N., The effect of ionizing radiations on cholesterol levels of adrenals, liver and plasma. Radiat. Res., 1966, 29, 608-613.

26 - ENTENMAN C., NEVE R.A., SUPPLEE H. et OLMSTED C.A., Effects of X-irradiation on lipide metabolism. I. Plasma phospholipide levels in several species. Arch. Biochem. Biophys., 1955, 59, 97-105.

27 - SCHWARZ H.P., DREISBACH L., BARRIONUEVO M., KLESCHICK A. et KESTYK I. , The effect of ionizing irradiation on the lipid composition of the liver mitochondria of rats. Arch. Biochem. Biophys., 1961, 92, 133-139.

28 - SCHWARZ H.P., DREISBACH L., et POLIS E., Effect of whole-body X-ray irradiation on phospholipids of rat liver particulate fractions. Arch. Biochem. Biophys., 1965, 111, 422-430.

29 - SOPIN E.F. et GAIDAI V.M., Levels and turnover of phospholipids in normal animals and after radiation injury. Ukr. Biokhim. Zh., 1968, 40, 297-302 (in C.A. 1969, 70, 694 z).

30 - HEWITT J.E., HAYES T.L., GOFMAN J.W., JONES H.B. et PIERCE F.T., Effects of total body irradiation upon lipoprotein metabolism. Am. J. Physiol., 1953, 172, 579-587.

31 - GOLDWATER W.H. et ENTENMAN C., Effect of X-irradiation on lipid metabolism. III. Dog serum lipoproteins. Radiat. Res., 1956, 4, 243-256.

32 - BIERI J.G. et ANDERSON A.A., Peroxidation of lipids in tissue homogenates as related to vitamin E. Arch. Biochem. Biophys., 1960, 90, 105-110.

33 - CHIPAULT J.R. et MIZUNO G.R., Effect of ionizing radiations on stability of fats. J. Agr. Food Chem., 1966, 14, 225-229.

34 - WILLS E.D. et ROTBLAT J., The formation of peroxides in tissue lipids and unsaturated fatty acids by irradiation. Int. J. Rad. Biol., 1964, 8, 551-567.

35 - WILLS E.D. et WILKINSON A.E., Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation of lipid peroxide formation to enzyme release. Biochem. J., 1966, 99, 657-666.

36 - WILLS E.D. et WILKINSON A.E., The effect of irradiation on lipid peroxide formation in subcellular fractions. Radiat. Res., 1967, 31, 732-747.

37 - WILLS E.D., Effect of irradiation on sub-cellular components. I. Lipid peroxide formation in the endoplasmic reticulum. Int. J. Radiat. Biol., 1970, 17, 217-228.

38 - MYERS D.K. et BIDE R.W., Biochemical effects of X-irradiation on erythrocytes. Radiat. Res., 1966, 27, 250-263.

39 - SUTHERLAND R.M. et PIHL A., Repair of radiation damage to erythrocyte membranes : the reduction of radiation-induced disulfide groups. Radiat. Res., 1968, 34, 300-314.

40 - BAKER N. et WILSON L., Water-soluble products of UV-irradiated, autoxidized linoleic and linolenic acids. J. Lipid Res., 1966, 7, 341-348.

41 - UGAZIO G. et GABRIEL L., Ricerche su alcune fasi della perossidazione lipidica in vitro. Biol. Sper., 1966, 42, 1749-1752.

42 - DODGE J.T., COHEN G., KAYDEN H.J. et PHILLIPS G.B., Peroxidative hemolysis of red blood cells from patients with abetalipoproteinemia (Acanthocytosis). J. Clin. Invest., 1967, 46, 357-368.

43 - JACOB H.S. et LUX S.E., Degradation of membrane phospholipids and thiols in peroxide hemolysis : studies in vitamin E deficiency. Blood , 1968, 32, 549-568.

44 - CLARK D.A., FOULDS E.L. et WILSON F.H., Effects of hydrogen peroxide on lipoproteins and associated lipids. Lipids, 1969, 4, 1-8.

45 - ZALKIN H. et TAPPEL A.L., Mechanism of vitamin E action. IV. Lipide peroxidation in the vitamin E-deficient rabbit. Arch. Biochem. Biophys., 1960, 88, 113-117.

46 - HOCHSTEIN P. et ERNSTER L., Adenosine diphosphate ( A D P) activated lipid peroxidation coupled to reduced triphosphopyridine nucleotide (T P N H) oxidase system of microsomes. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1963, 12, 388-394.

47 - KANN H.E, MENGEL C.E., SMITH W.et HORTON B., Oxygen toxicity and vitamin E. Aerospace medicine, 1964, 35, 840-814.

48 - MAY H.E., PØYER J.L. et Mc CAY P.B., Lipid alterations occurring in microsomes during the enzymic oxidation of TPNH. Biochem. Biophys. Res. Commun.,1965, 19, 166-170.

49 - TAM B.K., et Mc CAY P.B., Produced triphosphopyridine nucleotide oxidase catalyzed alterations of membrane phospholipids. III. Transient formation of phospholipid peroxides. J. Biol. Chem., 1970, 245, 2295-2300.

50 - GOLDSTEIN B.D. et BALCHUM O.J., Effect of ozone on lipid peroxidation in the red blood cell. Proc. Soc. Expt.Biol. Med., 1967, 126, 356-358.

51 - DI LUZIO N.R., et HARTMAN A.D., Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver. Fed. Proc., 1967, 26, 1436-1442.

52 - DODGE J.T., et PHILLIPS G.B., Autoxidation as a cause of altered lipid distribution in extract from human red cells. J. Lipid Res., 1966, 7, 387-395.

53 - TAPPEL A.L., Lipoxidase. In The enzymes (BOYER P.D., LARDY H. et MYRBACK K.), Vol. 8, Academic Press, New-York et Londres, 1963, p. 275-283.

54 - DOLEV A., ROHWEDDER W.K., et DUTTON H.J., Mechanism of lipoxidase reaction. I. Specificity of hydroperoxidation of linoleic acid. Lipids, 1967, 2, 28-32.

55 - HAMBERG M. et SAMUELSSON B., Specificity of the lipoxidase catalyzed oxygenation of unsaturated fatty acids. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 21, 531-536.

56 - HAMBERT M. et SAMUELSSON B., On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase. J. Biol. Chem., 1967, 242, 5329-5335.

57 - GARDNER H.W., Sequential enzymes of linoleic acid oxidation in corn germ : lipoxygenase and linoleate hydroperoxide isomerase. J. Lipid Res., 1970, 11, 311-321.

58 - GRAVELAND A., Enzymatic oxidations of linoleic acid and glycerol -1- monolinoleate in doughs and flour-water suspensions. J. Am. Oil. Chemists'Soc., 1970, 47, 352-361.

59 - KUZIN A.M. et MERKULOV A.S., Activity of lipoxidase in $\gamma$-irradiated seeds. Radiobiologiya, 1965, 5, 571-575 (In C.A. 1965, 63, 16747 h).

60 - HAMBERG M. et SAMUELSSON B., Oxygenation of unsaturated fatty acids by the vesicular gland of sheep. J. Biol. Chem., 1967, 242, 5344-5354.

61 - FARMER E.H. et SUTTON D.A., Course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds . IV. The isolation and constitution of photochemically - formed methyl oleate peroxide. J. Chem. Soc., 1943, 119-122.

62 - HOLMAN R.T., Autoxidation of fats and related susbstances. In Progress in the chemistry of fats and other lipids (R.T. HOLMAN, W.O. LUNDBERG et T. MALKIN), Vol. 2, Academic Press, New-York, 1954, p. 51.

63 - DAHLE L.K., HILL E.G. et HOLMAN R.T., The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. Arch. Biochem. Biophys., 1962, 98, 253-261.

64 - HYDE S.M. et VERDIN D., Oxidation of methyl oleate induced by $^{60}Co$ $\gamma$-radiation. I. Pure methyl oleate. II. Emulsions of methyl oleate in water. Trans. Far. Soc., 1968, 64, 144-162.

65 - PAQUOT C., MERCIER J. et REVEILLON F., Obtention d'hydroxy-époxy-stéarate de méthyle par autoxydation d'oléate de méthyle. C.R. Acad. Sc.,Paris, 1967, 265, 831-833.

66 - RAMANATHAN V., SAKURAGI T. et KUMMEROW F.A., Thermal oxidation of methyl esters of fatty acids. J. Am. Oil. Chemists' Soc., 1959, 36, 244-248.

67 - BRODNITZ M.H., NAWAR W.W. et FAGERSOW I.S., Autoxidation of saturated fatty acids. II. The determination of the site of hydroperoxide groups in autoxidizing methyl palmitate. Lipids, 1968, 3, 65-71.

68 - BRODNITZ M.H., NAWAR W.W. et FAGERSOW I.S., Autoxidation of saturated fatty acids. I. The initial products of autoxidation of methyl palmitate. Lipids, 1968, 3, 59-64.

69 - THALER H., et KLEINAU H.J., Uber die autoxydation gesattigter fettsauren. IV. Sauentoff-verbrauch und bildung von peroxides bei der oxydation von laurin und steainsaure sewi ihrer methylester. Fette, Seifen, Anstrichm., 1968, 70, 465-471.

70 - THALER H. et KLEINAU H.J., Uber die autoxydation gesattigter fettsauren. V. Angriff des sauerstoffes und bildung von peroxiden bei der oxydation von lauren und staarinsaure sewie ihrer methylester. Fette, Seifen, Anstrichm., 1969, 71, 92-98.

71 - BURTON V.L., Effects of radioactivity on oleic acid. J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 4117-4119.

72 - CHANG S.S. et KUMMEROW F.A., The volatile decomposition products and the organoleptic characteristics of the oxidative polymers of ethyl linoleate. J. Am. Oil Chemists' Soc., 1953, 30, 251-254.

73 - MERRITT C., ANGELINI P., BAZINET M.L. et Mc ADOO D.J., Irradiation damage in lipids. Adv. Chem. Series, 1966, 56, 225-240.

74 - HORVAT R.J., Mc FADDEN W.H., BLACK D.R., LANE W.G. et TEETER R.M., Volatile products from mild oxidation of methyl linoleate. Analysis by combined mass spectrometry-gas chromatography. J. Am. Oil Chemists' Soc., 1965, 42 , 1112-1115.

75 - HORVAT R.J., Mc FADDEN W.H., LANE W.G. et SHEPHERD A.D., Identification of 2, 4, 6 - trialkyl- 1, 3, 5, - trioxanes from autoxidized methyl linoleate by mass spectometry. J. Am. Oil Chemists' Soc., 1966, 43, 350-351.

76 - SCHAUENSTEIN E., Autoxidation of polyunsaturated esters in water : chemical structure and biological activity of the products. J. Lipid Res., 1967, 8, 417-428.

77 - HORVAT R.J., Mc FADDEN W.H., LANE W.G., LEE A., LUNDIN R.E., SCHERER J.R., et SHEPHERD A.D., Identification of some acids from autoxidation of methyl linoleate. J. Am. Oil Chemists' Soc., 1969, 46, 94-96.

78 - GUILLET J.E. et GILMER J.C., Decomposition of lauroyl, decanoyl and octanoyl peroxides in solution. Canadian J. Chem., 1969, 47, 4405.

79 - CHRISTOPHERSEN B.O., Reduction of linolenic acid hydroperoxide by a glutathione peroxidase. Biochim. Biophys. Acta, 1969, 176, 463-470.

80 - HOWTON D.R. et WU G.S., $\gamma$-Radiolysis of oleic acid. J. Am. Chem. Soc., 1967, 89, 516-525.

81 - ZEMAN A., et SCHARMANN H., Mass spectrometric investigation of dimeric fatty acids from frying-fats subjected to thermal and oxidative action. Fette, Seifen, Anstrichm., 1969, 71, 957-960. (In C.A. 1970, 72, 53827 t).

82 - MOUNTS T.L., Mc WEENY D.J., EVANS C.D. et DUTTON H.J., Decomposition of linoleate hydroperoxides : precursors of oxidative dimers. Chem. Phys. Lipids, 1970, 4, 197-202.

83 - PAQUOT C., Les peroxydes dans le domaine des corps gras. In Les peroxydes organiques en radiobiologie. Actions chimiques et biologiques des radiations (HAISSINSKY M.), Masson, Paris, 1958, p. 3-17.

84 - WITTING L.A. et SCHWEIGERT B.S., A Characterization of volatile carbonyl compounds isolated from meat fat subjected to gamma radiation. J. Am. Oil. Chemists' Soc., 1958, 35, 413-416.

85 - DUBRAVCIC M.F. et NAWAR W.W., Effects of high energy radiation on the lipids of fish. J. Agr. Food. Chem.,1969, 17, 639-644.

86 - CHAMPAGNE J.R., et NAWAR W.W., The volatile components of irradiated beef and pork fats. J. Food. Sci., 1969 34, 435-439.

87 - WURZIGER J. et SALZER U., Oxy acids in the assessment of thermally treated fats. Fette, Seifen, Anstrichm., 1969, 71, 365-367. (In C.A. 1969, 71, 23128 f).

88 - DESAI I.D., et TAPPEL A.L., Damage to proteins by peroxidized lipids. J. Lipid Res., 1963, 4, 204-207.

89 - NARAYAN K.A. et KUMMEROW F.A., Factors influencing the formation of complexes between oxidized lipids and proteins. J. Am. Oil Chemists' Soc., 1963, 40, 339-342.

90 - FILER L.J., RUMERY R.E. et MASON K.E., Specific unsaturated fatty acids in the production of acid-fast pigment in the vitamin E-deficient rat and the protective action of tocopherols. Biol. Antioxidants, Trans. 1 st Conf., New-York, 1946, 67-77.

91 - LILLIE R.D., ASHBURN L.L., SEBRELL W.H., DAFT F.S. et LOWRY J.V., Histogenesis and repair of the hepatic cirrhosis in rats produced on low-protein diets and preventable with choline. U.S. Pub. Health Repts., 1942, 57, 502-508.

92 - KUKUZUMI K., Lipids of atherosclerotic artery. The cause of atherosclerosis from the viewpoint of fat chemistry. Fette, Seifen, Anstrichm., 1969, 71, 953-957 , (In J. Am Oil Chemists' Soc., 1970, 47, 538 A).

93 - ROUBAL W.T., TAPPEL A.L., Polymerization of proteins induced by free-radical lipid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys., 1966, 113, 150-155.

94 - CHUNG O., FINNEY K.F. et POMERANZ J., Lipids in flour from gamma-irradiated wheat. J. Food Sci.,1967, 32, 315-317.

95 - MAY H.E. et Mc CAY P.B., Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase catalyzed alterations of membrane phospholipids. I. Nature of the lipid alterations. J. Biol. Chem., 1968 243, 2288-2295.

96 - KOHN H.I. et LIVERSEDGE M., A new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, adrenaline and menadione. J. Pharmacol., 1944, 82, 292-300.

97 - BERNHEIM F., BERNHEIM M. et WILBUR K., The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. J. Biol. Chem., 1948, 174, 257-264.

98 - PATTON S. et KURTZ G.W., 2-thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk-fat oxidation. J. Dairy Sci., 1951, 34, 669-74.

99 - TAEUFEL K. et ZIMMERMANN R., The chemistry of the color reaction between 2-thiobarbituric acid and carbonyl compounds. Fette, Seifen, Anstrichm., 1961, 63, 226-234 (In C.A. 1961, 55, 15964 c).

100 - SCHMIDT H.,
Fette, Seifen, Anstrichm., 1964, 29, 294.

101 - WILBUR K.M., BERNHEIM F. et SHAPIRO O.W., Thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. Arch. Biochem. Biophys., 1949, 24, 305-313.

102 - PLACER Z.A., CUSHMAN L.L. et JOHNSON B.C., Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. Anal. Biochem., 1966, 16, 359-364.

103 - SINNHUBER R.O., YU T.C. et TU T.C., Characterization of the red pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. Food Res., 1958, 23, 626-633.

104 - MENGEL C.E. et KANN H.E., Effects of in vivo hyperoxia on erythrocytes. III. In vivo peroxidation of erythrocyte lipid. J. Clin. Invest., 1966, 45, 1150.

105 - OTTOLENGHI A., Interaction of ascorbic acid and mitochondrial lipids. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 79, 355-363.

106 - TSEN C.C. et COLLIER H.B., The protective action of tocopherol against hemolysis of rat erythrocytes by dialuric acid. Canad. J. Biochem. Physiol., 1960, 38, 957-964.

107 - MENGEL C.E., KAHN H.E., et MERIWETHER W.D., Studies of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes ; increased lysis and lipid peroxide formation by hydrogen peroxide. J. Clin. Invest., 1967, 46, 1715-1723.

108 - STOCKS J. et DORMANDY T.L., A direct thiobarbituric acid-reacting chromogen in human red blood cells. Clin. Chim. Acta, 1970, 27, 117-120.

109 - DONNAN S.K., The thiobarbituric acid test applied to tissues from rats treated in various ways. J. Biol. Chem., 1950, 182, 415-419.

110 - SERAFINI-CESSI F., et CESSI C., Thiobarbituric acid test as and index of phospholipid peroxidation. Sperimentale, 1968, 118, 371-378 (In C.A. 1969, 71, 78097 x).

111 - TAPPEL A.L. et ZALKIN H., Lipide peroxidation in isolated mitochondria. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 80, 326-332.

112 - SINNHUBER R.O. et YU T.C., 2-thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II. The quantitative determination of malonaldehyde. Food Technol., 1958, 12, 9-12.

113 - WILLS E.D., Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. Biochem. J., 1966, 99, 667-676.

114 - HIRANO G., MORISUE M., Lipid peroxides. Serum constituents which give positive thiobarbituric acid reactions. Kyusku Yakugakkai Kaiho, 1968, 22, 53-56. (In C.A. 1969, 71 27827 c).

115 - YAMAZAKI S., Vital lipid peroxides. II. Measurement of lipid peroxides. 1. Thiobarbituric acid method. Rinsho Byori, 1967, 15, 616-619 (In C.A. 1968 68, 57307p).

116 - KITABCHI A.E. et WILLIAMS R.H., Adrenal gland in vitamin E deficiency. Lipid peroxidation and malonaldehyde production in vitro. J. Biol. Chem., 1968, 243, 3248-3254.

117 - NISHIGAKI I., OSAWA T. et YAGI K., Analysis of lipid peroxides in serum. Bitamin, 1968, 38, 359-368 (In C.A. 1969, 70, 18155 j).

118 - PHILPOT J.L., Estimation and identification of organic peroxides. Radiat. Res. Suppl., 1963, 3, 55-70.

119 - OKUMA M., STEINER M. et BALDINI M., Studies on lipid peroxides in platelets. I. Method of assay and effect of storage. J. Lab. Clin. Med., 1970, 75, 283-296.

120 - PLACER Z., VESELKOVA A. et RATH R., Kinetik des malondialdehydes im organismus. Experientia, 1965, 21, 19-20.

121 - RECKNAGEL R.O. et GHOSHAL A.K., Lipoperoxidation as vector in carbon tetrachloride hepatotoxicity. Lab. Invest., 1966, 15, 132-148.

122 - HASHIMOTO S., GLENDE E.A. et RECKNAGEL R. O., Hepatic lipid peroxidation in acute fatal human carbon tetrachloride poisoning. New England J. Med., 1968, 20, 1082-1085.

123 - LEA C.H., Some observations on the preparation and properties of phosphatidylethanolamine. In Biochemical problems of lipids (POPJAK G. et LE BRETON E.), Butherworths Scientific Publications, Londres, 1956, p. 81-90.

124 - HAMM D.L., HAMMOND E.G., PARVANAH V. et SNYDER H.E., The determination of peroxides by the stamm method. J. Am. Oil. Chemists' Soc., 1965, 42, 920-922.

125 - STAMM J., Evidence of decomposition in oils and fats. Bull. Soc. Pharm. Esthonia., 1925, 5, 181.

126 - GLIMM E., KUDZINSKI L. et FLEISCHAUER H., Is diphenylcarbazide suitable for the detection of rancid fats ? Fette, Seifen. Anstrichm., 1938, 45, 496-499. (In C.A. 1939, 33, $1527^{4}$).

127 - KRUMHOLZ P. et WATZEK H., Autoxidation of diphenylcarbazone. Monatsh. Chem., 1937, 70, 437-446. (In C.A. 1938, 32, $126^{9}$).

128 - WHEELER D.H., Peroxide formation as a measure of autoxidative deterioration. "Oil and soap" 1932, 9, 89-97.

129 - KALISH G.H. et DI LUZIO N.R., Peroxidation of liver lipids in the pathogenesis of the ethanol-induced fatty liver. Science, 1966, 152, 1390-1392.

130 - WILLS E.D., Mechanism of lipid peroxide formation in tissues. Role of metals and haematin protein in the catalysis of the oxidation of unsaturated fatty acids. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 98, 238-251.

131 - KENASTON C.B., VILBUR D.M., OTTOLENGHI A. et BERNHEIM F., Comparison of methods for determining fatty acid oxidation produced by ultraviolet irradiation. J. Am. Oil Chemists' Soc., 1955, 32, 33-35.

132 - WILLS E.D., The effect of inorganic iron on the thiobarbituric acid method for the determination of lipid peroxides. Biochim. Biophys. Acta, 1964, 84, 475-477.

133 - MAY H.E. et Mc CAY P.B., Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. II. Enzymic properties and stoichiometry J. Biol. Chem., 1968, 243, 2296-2305.

134 - BERNHEIM F., Biochemical implications of prooxidants and antioxidants. Radiat. Res. Suppl., 1963, 3, 17-32.

135 - SCHULMAN J.H. et COCKBAIN E.G., Molecular interactions at oil-water interfaces. I. Molecular complex formation and the stability of oil-in-water emulsions. Trans. Faraday Soc., 1940, 36, 651-661.

136 - VICTORIA E.J. et BARBER A.A., Peroxidation of microsomal membrane protein-lipid complexes.Lipids, 1969, 4, 582-588.

137 - BARBER A.A., Mechanisms of lipid peroxide formation in rat tissue homogenates. Radiat. Res. Suppl., 1963, 3, 33-43.

138 - WOLFSON N., WILBUR K. M. et BERNHEIM F., Lipide peroxide formation in regenerating rat liver. Exptl. Cell. Research, 1956, 10, 556-558.

139 - ROBINSON J.D., Structural changes in microsomal suspensions. III. Formation of lipid peroxides. Arch. Biochem. Biophys., 1965, 112, 170-179.

140 - HAASE F. et DUNKLEY W.L., Ascorbic acid and copper in linoleate oxidation. II. Ascorbic acid and copper as oxidation catalysts. J. Lipid. Res., 1969, 10, 561-567.

141 - TAPPEL A.L., The mechanism of vitamin E action. III. In vitro copolymerization of oxidized fats with protein. Arch. Biochem. Biophys., 1955, 54, 266-280.

142 - MAIER V.P. et TAPPEL A.L., Rate studies of unsaturated fatty acid oxidation catalyzed by hematin compounds. J. Am. Oil Chemists' Soc., 1959, 36, 8-12.

143 - TAPPEL A.L., BROWN W.D., ZALKIN H. et MAIER V.P., Unsaturated lipid peroxidation catalyzed by hematin compounds ant its inhibition by vitamin E. J.Am.Oil Chemists' Soc., 1961, 38, 5-9.

144 - LEWIS S.E. et WILLS E.D., Inhibition of the autoxidation of unsaturated fatty acids by haematin proteins. Biochim. Biophys. Acta, 1963, 70, 336-338.

145 - KENDRICK J. et WATTS B.M., Acceleration and inhibition of lipid oxidation by heme compounds. Lipids, 1969, 4, 454-458.

146 - HUNTER F.E., SCOTT A., GEBICKI J.M., HOFFSTEM P.E. et WEINSTEIN J., Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. J. Biol. Chem.,1963, 238, 828-835.

147 - Mc KNIGHT R.C., HUNTER F.E. et OEHLERT W.H., Mitochondrial membrane ghosts produced by lipid peroxidation induced by ferrous ion. J. Biol. Chem., 1965, 240, 3439-3446.

148 - Mc KNIGHT R.C. et HUNTER F.E., Effects of inorganic iron on the thiobarbituric acid method for determination of lipid peroxides. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 98, 640-643.

149 - WILLS E.D., Lipid peroxide formation in microsomes. The role of non-haem iron. Biochem. J., 1969, 113, 325-332.

150 - TAPPEL A.L., Vitamin E as the biological lipid antioxidant. Vitam. and Horm., 1962, 20, 493-510.

151 - TAPPEL A.L. et ZALKIN H., Inhibition of lipide peroxidation in mitochondria by vitamin E. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 80, 333-336.

152 - TAPPEL A.L. et ZALKIN H., Inhibition of lipide peroxidation in microsomes by vitamin E. Nature 1959, 185, 35.

153 - HOCHSTEIN P., NORDENBRAND K. et ERNSTER L., Evidence for the involvement of iron in the ADP - activated peroxidation of lipids in microsomes and mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1964, 14, 323-328.

154 - BARBER A.A., Inhibition of lipid peroxide formation by vertebrate blood serum. Arch. Biochem. Biophys., 1961, 92, 38-43.

155 - PLACER Z., SLABOCHOVA Z., et VESELKOVA A., Biological effect of antioxidants. Nahrung, 1964, 8, 333-339 (In C.A. 1964, 61, 4783c).

156 - PLACER Z., VESELY K.T. et SLABOCHOVA Z., Inhibitor of peroxidation of lipids in the protein fractions of human blood serum. Naturwissenschaften, 1964, 51, 196. (In C.A. 1964, 61, 2258 f).

157 - PLACER Z., VESELKOVA A. et RYBAK M., Effect of transferrin on lipoperoxidation. Naturwissenschaften, 1964, 51, 438-439. (In C.A. 1964, 61, 15121 g).

158 - CHRISTOPHERSEN B.O., Inhibitory effect of reduced glutathione on the lipid peroxidation of the microsomal fraction and mitochondria. Bioch. J., 1968, 106, 515-522.

159 - CHRISTOPHERSEN B.O., Formation of monohydroxypolyenoic fatty acids from lipid peroxides by a glutathione peroxidase. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 164, 35-46.

160 - KWON T.W. et BROWN W.D., Complex formation between malonaldehyde and bovine serum albumin. Fed. Proc., 1965, 24, 592.

161 - BUTTKUS H., The reaction of myosin with malonaldehyde. J. Food Science, 1967, 32, 432-434.

162 - CRAWFORD D.L., YU T.C. et SINNHUBER R.O., Reaction of malonaldehyde with protein. J. Food Sci., 1967, 32, 332-335.

163 - DUBOULOZ P., FONDARAI J. et LAGARDE C., Action of tissues on ethyl oleate containing oleic peroxide. C.R. Soc. Biol., 1949, 143, 92.

164 - DUBOULOZ P., FONDARAI J. et LAGARDE C., Metabolism of peroxides of fatty acid esters. Biochim. Biophys. Acta, 1949, 3 , 371-377.

165 - DUBOULOZ P., LAURENT J. et DUMAS J., Sur le métabolisme des peroxydes lipidiques. I. Caractérisation d'un pigment hématinique détruisant les peroxydes. Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33 , 1740-1744.

166 - DUBOULOZ P. et FONDARAI J., Sur le métabolisme des peroxydes lipidiques. II. Action des peroxydes lipidiques sur les groupements thiols protéiques. Bull. Soc. Chim. Biol., 1953, 35, 819-826.

167 - DUBOULOZ P., FONDARAI J. et PRACCIA J.P., Sur le métabolisme des peroxydes lipidiques. III. Mécanisme de la destruction des peroxydes lipidiques par les tissus animaux. Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36, 893-900.

168 - FREEMAN I.P., The metabolism of linoleic acid hydroperoxides. Chem. Ind., 1964, 1543.

169 - O'BRIEN P.J. et FRAZER A.C., The effect of lipid peroxides on the biochemical constituents of the cell. Proc. Nutr. Soc., 1966, 25, 9-18.

170 - FREEMAN I.P. et O'BRIEN P.J., The metabolism of a lipid peroxide. Biochem. J., 1967, 102, 9P-10P.

171 - CRAWFORD D.L., SINNHUBER R.O., STOUT F.M., OLDFIELD J.E. et KAUFMES J., Acute toxicity of malonaldehyde. Toxicol. Appl. Pharmacol., 1965, 7, 826-832.

172 - CRAWFORD D.L., Malonaldehyde : certain chemical and biological properties. Food Technol., 1966, 27, 203.

173 - JANOTA-BASSILIK L. et WRIGHT L.D., Pimelic acid as a by-product of azelaic acid degradation by a pseudomonas species. Nature, 1964, 204, 501-502.

174 - OGATA K., TOCHIKURA T., OSUGI M. et IWAHARA S., Fatty acid metabolism in microorganisms. I. Production of pimelic acid from azelaic acid. Agr. Biol. Chem., 1966, 30, 176-180.

175 - JANOTA-BASSILIK L. et WRIGHT L.D., Azelaic acid utilization by a pseudomonas. J. Gen. Microbiol., 1964, 36, 405-414.

176 - OGATA K., OSUGI M. et TOCHIKURA T., Fatty acid metabolism in microorganisms.II. Production of α-ketoglutaric acid from fatty acids. Agr. Biol. Chem., 1966, 30, 1024-1029.

177 - VON GREUB H.R. et BERNHARD K., Azelainsäure, ein weiterer bestandteil des menschlichen harns.Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 1967, 5, 217-218.

178 - BAER J. et BLUM L., On the influence of chemical substances upon the elimination of sugar, and upon acidosis (II). Beitr. Chem. Physiol., 1908, 11, 101. (In C.A. 1908, 2, 2098).

179 - SMITH H.G., The metabolism of azelaic acid. J. Biol. Chem., 1933, 103, 531-535.

180 - FLASCHENTRÄGER G., Behavior of dicarboxylic acids and sebamic acid in the animal body. Z. Physiol. Chem., 1926, 159, 297-308. (In C.A. 1927, 21, 258).

181 - MAZZA F.P., The biological oxidation of aliphatic dibasic acids and ω-oxidation of monobasic fatty acids. Arch. Sci. Biol., 1936, 22, 307-325.

182 - BERNHARD K., Biological degradation of fat acids through methyl oxidation. Recovery and metabolism of dicarboxylic acids containing deuterium. Helv. Chim. Acta, 1941, 24, 1412-1425.

183 - BLOOR W.R., Biochemistry of the fatty acids and their compounds, the lipids. Reinhold Pub. Corp.,New York, 1943, p.321-322.

184 - O'BRIEN P.J., The effects of hydroperoxides on mitochondrial metabolism. Chem. Ind., 1964, 1544.

185 - BACQ Z.M. et ALEXANDER P., Fundamentals of radiobiology, Pergamon Press, London, 2 nd ed., 1961, p.272.

186 - WARAVDEKAR V.S., ANDERSON H.J., SASLAW L.D. et SMETANA H.F., Hepatotropic effect in mice by an aqueous extract of ultra-violet irradiated linolenic acid. Nature, 1964, 202, 1009.

187 - TAPPEL A.L., Free radical lipid peroxidation damage and its inhibition by vitamin E and selenium. Fed. Proc., 1965, 24, 73-78.

188 - WILLS E.D., Lipid peroxide formation in microsomes. Relation of hydroxylation to lipid peroxide formation. Bioch. J., 1969, 113, 333-341.

189 - WILLS E.D. et WILKINSON A.E., Effects of irradiation on sub-cellular components. II. Hydroxylation in the microsomal fraction. Int. J. Rad. Biol., 1970, 17, 229-236.

190 - BERNHEIM F., WILBUR K.M. et KENASTON C.B., The effect of oxidized fatty acids on the activity of certain oxidative enzymes. Arch. Biochem. Biophys., 1952, 38, 177-184.

191 - SAKA O. et IMREN H., Advances in Thyroid Reseach, Pergamon Press, New York, 1961, p. 520.

192 - DUBOULOZ P. et DUMAS J., Sur le métabolisme des peroxydes lipidiques. IV. Présence des peroxydes lipidiques dans la peau au cours des processus "inflammatoires". Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36, 983-991.

193 - WILLS E.D., Effect of fatty acids and their peroxides on enzymes. Biochem. Pharmacol., 1961, 7, 7-16.

194 - LEWIS S.E. et WILLS E.D., The destruction of-SH groups of proteins and amino acids by peroxides of unsaturated fatty acids. Biochem. Pharmacol., 1962, 11, 901-912.

195 - LITTLE C. et O'BRIEN P.J., Oxidation of small thiols by lipid peroxides. Biochem. J., 1967, 102, 10P.

196 - CAPILNA-SIMION S., Effect of lipid peroxides on enzymic systems. Rev. Roum. Physiol., 1968, 5, 217-24 (In C.A. 1962, 70, 54352 e).

197 - TAPPEL A.L., Vitamin E and selenium in the vivo lipid peroxidation. In Symposium on foods : Lipids and their oxidation (SCHULTZ H.W.), The Avi publishing Co., Westport, 1962, p.367.

198 - HOCHSTEIN P. et ERNSTER L., Microsomal peroxidation of lipids and its possible role in cellular injury. In Ciba Foundation Symposium on cellular injury, (DE REUCK et KNIGHT). Londres, 1964, p.123-134.

199 - FRAZER C.B.E., Biological effects of oxidized and heated fats. Chem Ind., 1964, 1541-1543.

200 - NISHIDA T. et KUMMEROW F.A., Interaction of serum lipoproteins with the hydroperoxide of methyl linoleate. J. Lipid Res., 1960, 1, 450-458.

201 - NAITO H., JOHNSON B. et JOHNSON B.C., Effects of methyl linoleate hydroperoxide on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 1966, 122, 545-548.

202 - CLARK J.B., Effect of irradiation in vitro on mitochondrial metabolism. Oxidation of citric acid cycle substrates. European J. Biochem., 1967, 2, 19- 25.

203 - O'BRIEN P.J. et GREEN R.C., Effects of a lipid peroxide on intracellular metabolism. Biochem. J., 1967, 103, 32 P.

204 - SHUSTER C.W., Effects of oxidized fatty acids on ascites tumor metabolism. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 1955, 90, 423-426.

205 - LITTLE C. et O'BRIEN P.J., The effectiveness of a lipid peroxide in oxidizing protein and non-protein thiols. Biochem. J., 1968, 106, 419-423.

206 - LITTLE C. et O'BRIEN P.J., Mechanism of peroxide-inactivation of the sulphydryl enzyme glyceraldehyde-3 phosphate deshydrogenase. European J. Biochem., 1969, 10, 533-538.

207 - WILLS E.D. et WILKINSON A.E., The effect of irradiation on subcellular particles. Destruction of sulfhydryl groups. Int. J. Radiat. Biol., 1967, 13, 45-55.

208 - TSEN C.C. et COLLIER H.B., The relation between the glutathione content of rat erythrocytes and their hemolysis by various agents in vitro. Can. J. Biochem. Phys., 1960, 38, 981-987.

209 - SUTHERLAND R.M., STANNARD J.N. et WEED R.I., Involvement of sulphydryl groups in radiation damage to the human erythrocyte membrane. Int. J. Radiat. Biol., 1967, 12, 551-564.

210 - SHAPIRO B. et KOLLMANN G., The nature of the membrane injury in irradiated human erythrocytes. Radiat. Res., 1968, 34, 335-346.

211 - KOLLMANN G., SHAPIRO B. et MARTIN D., Mechanism of radiation hemolysis in human erythrocytes. Radiat. Res., 1967, 37, 551-566.

212 - KORATNUR M.G., BERGAN J.G. et DRAPER H.H., Observations on the decomposition of hemin by fatty acid hydroperoxides. Proc. Soc. Expt.Biol. Med., 1966, 122, 314-317.

213 - FISHER H. et VON DOBENECK H., The "pentdyopent" reaction. Z. Physiol. Chem., 1940, 263, 125-146. (In C.A. 1940, 34, $3770^{9}$).

214 - MOCHALINA A.S., Toxic effect of water-soluble oxidation products of irradiated linolenic acid. Mater. Vses. Soveschch. Radiobiol. Vop. Prir. Roli. Radiotoksinov Biol. Deistvii Ioniz. Radiats., 1965, 181-186. (In C.A. 1967, 67, 18237e).

215 - LANG K., Physiological effects of oxidized fats. Zesr. Probl. Postepow Nauk. Roln., 1968, 80, 237-251.

216 - BURSTEIN M. et SAMAILLE J., Nouvelle méthode de séparation et de dosage des lipoprotéines de faible densité.Ann. Biol. Clin., 1959, 17, 23-34.

217 - FOLCH J., LEES M. et SLOANE-STANLEY G.H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 1957, 226, 497-509.

218 - IMAICHI K., FUKUDA J.I. et NOTOMI A., Deterioration of unsaturated fatty acids on thin layer plate. J. Biochem., (Tokyo), 1966, 59, 189-191.

219 - FISKE C.H. et SUBBAROW Y., The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 1925, 66, 375-400.

220 - JARRIER M. et POLONOVSKI J., Méthode de dosage des acides gras estérifiés et son application au sérum sanguin. Bull. Soc. Chim. Biol., 1955, 37, 495-499.

221 - BOWYER D.E., LEAT W.M.F., HOWARD A.N. et GRESHAM G.A., The determination of the fatty acid composition of serum lipids separated by thin-layer chromatography ; and a comparison with column chromatography. Biochim. Biophys. Acta., 1963, 70, 423-431.

222 - ABRAMSON D. et BLECHER M., Quantitative two-dimensional thin-layer chromatography of naturally occurring phospholipids. J. Lipid Res., 1964, 5, 628-631.

223 - MORRISON W.R. et SMITH L.M., Preparation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. J. Lipid. Res., 1964, 5, 600-608.

224 - GRAY G.M., Separation of long-chain fatty aldehydes by gas-liquid chromatography. J. Chromatog., 1960, 4, 52-59.

225 - SWERN D., BILLEN G.N., FINDLEY T.W. et SCANLAN J.T., Hydroxylation of monounsaturated fatty materials with hydrogen peroxide. J. Am. Chem. Soc., 1945, 67, 1786-1789.

226 - HUBER W.F., A study of n-octadecenoic acids. I. Synthesis of cis-and trans-7- through 12-and of 17-octadecenoic acids. J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 2730-2733.

227 - ROSE H.G. et OKLANDER M., Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. J. Lipid. Res., 1965, 6, 428-431.

228 - DAVIS B.J., Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 404-427.

228 bis - DAWSON R.M.C., Analysis of phosphatides and glycolipids by chromatography of their partial hydrolysis or alcoholysis products. In Lipid chromatographic analysis (G.V. MARINETTI), vol. 1, M. Dekker inc., New York, 1967, p. 163-189.

229 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275.

230 - SKIPSKI W.P., BARCLAY M., BARCLAY R.K., FETZER V.A., GOOD J.J. et ARCHIBALD F.M., Lipid composition of human serum lipoproteins. Biochem. J., 1967, 104, 340-352.

231 - GOODMAN D.S. et SHIRATORI T., Fatty acid composition of human plasma lipoprotein fractions. J. Lipid Res., 1964, 5, 307-313.

232 - NICHOLS A.V., REHNBORG C.S. et LINDGREN F.T., Gas chromatographic analysis of fatty acids from dialyzed lipoproteins. J. Lipid Res., 1961, 2, 203-206.

233 - ZINZADZE C., Colorimetric methods for the determination of phosphorus. In the presence of silica, arsenic, iron and nitrates. Ind. Eng. Chem., 1935, 7, 227-230.

234 - HOEVET S.P., VISWANATHAN C.V. et LUNDBERG W.O., Fractionation of a natural mixture of alkenyl acyl-and diacyl choline phosphatides by argentation adsorption thin-layer chromatography. J. Chromatog., 1968, 34, 195-201.

235 - VISWANATHAN C.V., HOEVET S.P. et LUNDBERG W.O., Fractionation of a natural mixture of alkenyl acyl and diacyl ethanolamine phosphatides by argentation adsorption thin-layer chromatography. J. Chromatog., 1968, 35, 113-116.

236 - MAHADEVAN V., VISWANATHAN C.V. et LUNDBERG W.O., Thin layer chromatography of homologs and vinylogs of higher fatty aldehydes, dimethyl acetals, and 2,4-dinitrophenylhydrazones. J. Chromatog., 1966, 24, 357 -363.

237 - ELLMAN G.L., Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., 1959, 82, 70-77.

238 - DANCEWICZ A.M. et MAZANOWSKA A., Biochemical lesions induced in subcellular structures by ionizing radiation. VI. Formation of lipid peroxides in rat liver. Nukleonika, 1968, 13, 709-718. (In C.A., 1968, 69, 103593z).

239 - CONIGLIO J.G., DAVIS J.T. et AYLWARD S., Metabolism of ethyl arachidonate-1-$C^{14}$ in rats fed complete or fat-free diets. J. Nutrition, 1964, 84, 265-271.

240 - COOTS R.H., Metabolism of arachidonic acid-1-$^{14}C$ in the rat. J. Lipid Res., 1965, 6, 494-497.

241 - COOTS R.H., A comparison of the metabolism of cis, cis-linoleic, trans, trans-linoleic, and a mixture of cis, trans-and trans, cis-linoleic acids in the rat. J. Lipid Res., 1964, 5, 473-476.

242 - COOTS R.H., A comparison of the metabolism of elaidic, oleic, palmitic and stearic acids in the rat. J. Lipid Res., 1964, 5, 468-472.

243 - RENKONEN O., Chromatographic separation of plasmalogenic, alkyl-acyl, and diacyl forms of ethanolamine glycerophosphatides. J. Lipid Res. , 1968, 9, 34-39.

244 - MULDER E. et VAN DEENEN L.L.M., Metabolism of red-cell lipids. I. Incorporation in vitro of fatty acids into phospholipids from mature erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 106, 106-117.

245 - WINTERBOURN C.C. et BATT R.D., Incorporation of (1-$^{14}C$) palmitate into the lipids of bovine blood cells. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 152, 255-265.

246 - OLIVEIRA M.M. et VAUGHAN M., Incorporation of fatty acids into phospholipids of red blood cell membrane. Fed. Proc., 1962, 21, 296.

247 - OLIVEIRA M.M. et VAUGHAN M., Incorporation of fatty acids into phospholipids of erythrocyte membranes. J. Lipid Res., 1964, 5, 156-162.

248 - MULDER E., DE GIER J. et VAN DEENEN L.L.M., Selective incorporation of fatty acids into phospholipids of mature red cells. Biochim. Biophys. Acta, 1963, 70, 94-96.

249 - ABDULLA Y.H. et DAVISON A.N., Succinyl-phosphatides as intermediates in the succinate-dehydrogenase reaction of yeast. Biochem. J., 1965, 96, 10 C-12 C.

250 - HIRD F.J.R. et WEIDEMANN M.J., Oxidative phosphorylation accompanying oxidation of short-chain fatty acids by rat-liver mitochondria. Biochem. J., 1966, 98, 378-388.

251 - SKREDE S. et BREMER J., Oxidative phosphorylation accompagnying the β-oxidation of carnitine-bound fatty acids. Acta Chem. Scand., 1965, 19, 1995-1997.

252 - PRESSMAN B.C. et LARDY H.A., Effect of surface active agents on the latent ATP ase of mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 1955, 21, 458-466.

253 - BORST P., LOOS J.A., CHRIST E.J. et SLATER E.C., Uncoupling activity of long-chain fatty acids. Biochim. Biophys. Acta, 1962, 62, 509-518.

254 - BJORNTORP P., ELLS H.A. et BRADFORD R.H., Albumin antagonism of fatty acid effects on oxidation and phosphorylation reactions in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 1964, 239, 339-344.

255 - YAMAMOTO M., UTSUMI K., OHARA S., INABA K., YAMAMOTO G. et URAKAMI H., The relation between the composition of fatty acid from X-ray irradiated rabbit liver and its biochemical properties. Nippon Acta Radiologica, 1963, 23, 313-321.

256 - UTSUMI K., OHARA S., YAMAMOTO G., INABA K., URAKAMI H. et YAMAMOTO M., Mitochondrial swelling and uncoupling activity of long-chain fatty acids. Acta Med. Okayama, 1962, 16, 317-332.

257 - FALCONE A.B. et MAO R.L., The effects of long-chain fatty acids on orthophosphate adenosine 5-triphosphate exchange activity associated with oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 105, 233-245.

258 - AHMED K. et SCHOLEFIELD P.G., Effects of fatty acids on the $^{32}$P-adenosine triphosphate exchange reaction in rat liver mitochondria. Nature, 1960, 186, 1046-1047.

259 - WOJTCZAK L., ZALUSKA H. et DRAHOTA Z., Evidence for the activation of fatty acids in liver mitochondria by high-energy intermediates of oxidative phosphorylation. Biochim. Biophys. Acta, 1965, 98, 8-18.

# INDEX ALPHABETIQUE DES AUTEURS


| | Références |
|---|---|
| ABDULLA Y.H. et DAVISON A.N. | 240 |
| ABRAMSON D. et BLECHER M. | 222 |
| AHMED K. et SCHOLEFIELD P.G. | 259 |
| BACQ Z.M. et ALEXANDER P. | 185 |
| BAER J. et BLUM L. | 178 |
| BAKER N. et WILSON L. | 40 |
| BARBER A.A. | 137, 154 |
| BERNHARD K. | 182 |
| BERNHEIM F. | 134 |
| BERNHEIM F., BERNHEIM M. et WILBUR K. | 97 |
| BERNHEIM F., WILBUR K.M. et KENASTON C.B. | 190 |
| BERTI F. et UZARDI M.M. | 19 |
| BIERI J.G. et ANDERSON A.A. | 32 |
| BJORNTORP P., ELLS H.A. et BRADFORD R.H. | 255 |
| BLOOR W.R. | 183 |
| BORST P., LOOS J.A., CHRIST E.J. SLATER E.C. | 254 |
| BOWYER D.E., LEAT W.M.F., HOWARD A.N. et GRESHAM G.A. | 221 |
| BRODNITZ M.H., NAWAR W.W. et FAGERSOW I.S. | 67, 68 |
| BURSTEIN M. et SAMAILLE J. | 216 |
| BURTON V.L. | 71 |
| BUTTKUS H. | 161 |
| CAPILNA-SIMION S. | 196 |
| CASPARINI A.R., CAVINA G., MORETTA G. et QUINTILIANI L.M. | 14 |
| CHAMPAGNE J.R. et NAWAR W.W. | 86 |
| CHANG S.S. et KUMMEROW F.A. | 72 |
| CHIPAULT J.R. et MIZUNO G.R. | 33 |
| CHRISTOPHERSEN B.O. | 79, 158, 159 |
| CHUNG O., FINNEY K.F. et POMERANZ J. | 94 |
| CHUNG R.A., SHAW D.H. et SO E.S. | 18 |
| CLARK D.A., FOULDS E.L. et WILSON F.H. | 44 |
| CLARK J.B. | 202 |
| CLUBB M.E. et WILLS E.D. | 9 |
| CONIGLIO J.G., DAVIS J.T. et AYLWARD S. | 239 |
| COOTS R.H. | 240, 241, 242 |
| CRAWFORD D.L. | 172 |
| CRAWFORD D.L., SINNHUBER R.O., STOUT F.M., OLDFIELD J.E. et KAUFMES J. | 171 |

Références

CRAWFORD D.L., YU T.C. et SINNHUBER R.O. ..... 162
DAHLE L.K., HILL E.G. et HOLMAN R.T. ..... 63
DANCEWICZ A.M. et MAZANOWSKA A. ..... 238
DAVIS B.J. ..... 228
DAWSON R.M.C. ..... 228 bis
DESAI I.D. et TAPPEL A.L. ..... 88
DI LUZIO N.R. et HARTMAN A.D. ..... 51
DODGE J.T. et PHILLIPS G.B. ..... 52
DODGE J.T., COHEN G., KAYDEN H.J. et PHILLIPS G.B. ..... 42
DOLEV A., ROHWEDDER W.K., et DUTTON H.J. ..... 54
DONNAN S.K. ..... 109
DUBOULOZ P. et DUMAS J. ..... 192
DUBOULOZ P., FONDARAI J. ..... 166
DUBOULOZ P., FONDARAI J. et LAGARDE C. ..... 163, 164
DUBOULOZ P., FONDARAI J. et PRACCIA J.P. ..... 167
DUBOULOZ P., LAURENT J. et DUMAS J. ..... 165
DUBRAVCIC M.F. et NAWAR W.W. ..... 12, 85
ELLMAN G.L. ..... 237
ENTENMAN C., NEVE R.A., SUPPLEE H. et OLMSTED C.A. ..... 26
FALCONE A.B. et MAO R.L. ..... 261
FARMER E.H. et SUTTON D.A. ..... 61
FILER L.J., RUMERY R.E. et MASON K.E. ..... 90
FISHER H. et VON DOBENECK H. ..... 213
FISKE C.H. et SUBBAROW Y. ..... 219
FLASCHENTRÄGER G. ..... 180
FOLCH J., LEES M. et SLOANE-STANLEY G.H. ..... 217
FRAZER C.B.E. ..... 199
FREEMAN I.P. ..... 168
FREEMAN I.P. et O'BRIEN P.J. ..... 170
GARDNER H.W. ..... 57
GLIMM E., KUDZINSKI L. et FLEISCHAUER H. ..... 126
GOLDSTEIN B.D. et BALCHUM O.J. ..... 50
GOLDWATER W.H. et ENTENMAN C. ..... 31
GOODMAN D.S. et SHIRATORI T. ..... 231
GOULD R.G., BELLAND V.L. et LILLY E.H. ..... 24
GRAVELAND A. ..... 58
GRAY G.M. ..... 224
GUILLET J.E. et GILMER J.C. ..... 78
HAASE F. et DUNKLEY W.L. ..... 140
HAMBERG M. et SAMUELSSON B. ..... 55, 56, 60
HAMM D.L., HAMMOND E.G., PARVANAH V. et SNYDER H.E. ..... 124
HASHIMOTO S., GLENDE E.A. et RECKNAGEL R.O. ..... 122

Références

HEWITT J.E., HAYES T.L., GOFMAN J.W., JONES H.B. et PIERCE F.T. 30
HIRANO G., MORISUE M. 114
HIRD F.J.R. et WEIDEMANN M.J. 251
HOCHSTEIN P. et ERNSTER L. 46, 198
HOCHSTEIN P., NORDENBRAND K. et ERNSTER L. 153
HOEVET S.P., VISWANATHAN C.V. et LUNDBERG W.O. 234
HOLMAN R.T. 62
HORVAT R.J., Mc FADDEN W.H., BLACK D.R., LANE W.G. et TEETER R.M. 74
HORVAT R.J., Mc FADDEN W.H., LANE W.G. et SHEPHERD A.D. 75
HORVAT R.J., Mc FADDEN W.H., LANE W.G., LEE A., LUNDIN R.E., SCHERER J.R., et SHEPHERD A.D. 77
HOWTON D.R. et WU G.S. 80
HUBER W.F. 226
HUNTER F.E. , SCOTT A., GEBICKI J.M., HOFSTEM P.E. et WEINSTEIN J. 146
HYDE S.M. et VERDIN D. 64
IMAICHI K., FUKUDA J.I. et NOTOMI A. 218
JACOB H.S. et LUX S.E. 43
JANOTA-BASSILIK L. et WRIGHT L.D. 173, 175
JARRIER M. et POLONOVSKI J. 220
KALISH G.H. et DI LUZIO N.R. 129
KANN H.E.,MENGEL C.E., SMITH W. et HORTON B. 47
KENASTON C.B., VILBUR D.M., OTTOLENGHI A. et BERNHEIM F. 131
KENDRICK J. et WATTS B.M. 145
KITABCHI A.E. et WILLIAMS R.H. 116
KITAHARA K., TANAKA Y. et INOUE F. 11
KOHN H.I. et LIVERSEDGE M. 96
KOIKE H. et KOIKE N. 15
KOLLMANN G., SHAPIRO B. et MARTIN D. 211
KORATNUR M.G., BERGAN J.G. et DRAPER H.H. 212
KRUMHOLZ P. et WATZEK H. 127
KUKUZUMI K. 92
KUZIN A.M. et MERKULOV A.S. 59
KWON T.W. et BROWN W.D. 160
LANG K. 215
LATARJET R., EKERT B., APELGOT S. et REBEYROTTE N. 2
LEA C.H. 123
LEVITSKII A.P. 20
LEWIS S.E. et WILLS E.D. 144, 194
LILLIE R.D., ASHBURN L.L., SEBRELL W.H., DAFT F.S. et LOWRY J.V. 91
LITTLE C. et O'BRIEN P.J. 195, 205, 206

| | Références |
|---|---|
| LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. | 229 |
| LÜCK H. et KOHN R. | 10 |
| Mc KNIGHT R.C. et HUNTER F.E. | 148 |
| Mc KNIGHT R.C., HUNTER F.E. et OEHLERT W.H. | 147 |
| MAHADEVAN V., VISWANATHAN C.V. et LUNDBERG W.O. | 236 |
| MAIER V.P. et TAPPEL A.L. | 142 |
| MAY H.E. et Mc CAY P.B. | 95, 133 |
| MAY H.E., POYER J.L. et Mc CAY P.B. | 48 |
| MAZZA F.P. | 181 |
| MEAD J.F. | 8 |
| MEHRAN A.R., LOISELLE J.M. et BLAIS R. | 17 |
| MERRITT C., ANGELINI P., BAZINET M.L. et Mc ADOO D.J. | 73 |
| MENGEL C.E. et KANN H.E. | 104 |
| MENGEL C.E., KAHN H.E., et MERIWETHER W.D. | 107 |
| MOCHALINA A.S. | 214 |
| MORRISON W.R. et SMITH L.M. | 223 |
| MOUNTS T.L., Mc WEENY D.J., EVANS C.D. et DUTTON H.J. | 82 |
| MULDER E. et VAN DEENEN L.L.M | 244 |
| MULDER E., DE GIER J. et VAN DEENEN L.L.M. | 248 |
| MYERS D.K. et BIDE R.W. | 38 |
| NAITO H., JOHNSON B. et JOHNSON B.C. | 201 |
| NARAYAN K.A. et KUMMEROW F.A. | 89 |
| NICHOLS A.V., REHNBORG C.S. et LINDGREN F.T. | 232 |
| NIMS L.F. et SUTTON E. | 23 |
| NISHIDA T. et KUMMEROW F.A. | 200 |
| NISHIGAKI I., OSAWA T. et YAGI K. | 117 |
| NOTARIO A., DI MARCO N., DONEDA G., ZANETTI A. et SLAVIERO G. | 16 |
| NOTARIO A., SLAVIERO G.E., DI MARCO N. et BOBBIO-PALLAVICINI E. | 22 |
| O'BRIEN P.J. | 184 |
| O'BRIEN P.J. et FRAZER A.C. | 169 |
| O'BRIEN P.J. et GREEN R.C. | 203 |
| OGATA K., OSUGI M. et TOCHIKURA T. | 176 |
| OGATA K., TOCHIKURA T., OSUGI M. et IWAHARA S. | 174 |
| OHARA S., UTSUMI K. et YAMAMOTO M. | 13 |
| OKUMA M., STEINER M. et BALDINI M. | 119 |
| OLIVEIRA M.M. et VAUGHAN M. | 246, 247 |
| OTTOLENGHI A. | 105 |
| PACKER J.E. et WINCHESTER R.V. | 4 |
| PAQUOT C. | 83 |
| PAQUOT C., MERCIER J. et REVEILLON F. | 65 |
| PATTON S. et KURTZ G.W. | 98 |

Références

PHILPOT J.L. ..... 118
PLACER Z.A., CUSHMAN L.L. et JOHNSON B.C. ..... 102
PLACER Z., SLABOCHOVA Z., et VESELKOVA A. ..... 155
PLACER Z., VESELKOVA A. et RATH R. ..... 120
PLACER Z., VESELKOVA A. et RYBAK M. ..... 157
PLACER Z., VESELY K.T. et SLABOCHOVA Z. ..... 156
PRESSMAN B.C. et LARDY H.A. ..... 253
RAMANATHAN V., SAKURAGI T. et KUMMEROW F.A. ..... 66
RECKNAGEL R.O. et GHOSHAL A.K. ..... 121
RENKONEN O. ..... 243
REUSCHL H. ..... 6
RIESZ P. et WHITE F.H. ..... 3
ROBINSON J.D. ..... 139
ROSE H.G. et OKLANDER M. ..... 227
ROUBAL W.T., TAPPEL A.L. ..... 93
SAKA O. et IMREN H. ..... 191
SCHAUENSTEIN E. ..... 76
SCHERZ H. ..... 5
SCHMIDT H. ..... 100
SCHULMAN J.H. et COCKBAIN E.G. ..... 135
SCHWARZ H.P., DREISBACH L., et POLIS E. ..... 28
SCHWARZ H.P., DREISBACH L., BARRIONUEVO M., KLESCHICK A. et KESTYK I. ..... 27
SERAFINI-CESSI F., et CESSI C. ..... 110
SHAPIRO B. et KOLLMANN G. ..... 210
SHELLEY R.N. ..... 25
SHEPPARD C.W. et BURTON V.L. ..... 7
SHUSTER C.W. ..... 204
SINNHUBER R.O. et YU T.C. ..... 112
SINNHUBER R.O., YU T.C. et TU T.C. ..... 103
SKIPSKI W.P., BARCLAY M., BARCLAY R.K., FETZER V.A., GOOD J.J. et ARCHIBALD F.M. ..... 230
SKREDE S. et BREMER J. ..... 252
SMITH H.G. ..... 179
SOPIN E.F. et GAIDAI V.M. ..... 29
STAMM J. ..... 125
STOCKS J. et DORMANDY T.L. ..... 108
SUTHERLAND R.M. et PIHL A. ..... 39
SUTHERLAND R.M., STANNARD J.N. et WEED R.I. ..... 209
SWERN D., BILLEN G.N., FINDLEY T.W. et SCANLAN J.T. ..... 225

Références

TAEUFEL K. et ZIMMERMANN R. ..... 99
TAM B.K. et Mc CAY P.B. ..... 49
TAPPEL A.L. ..... 53, 141
TAPPEL A.L. et ZALKIN H. ..... 111, 151, 152
TAPPEL A.L., BROWN W.D., ZALKIN H. et MAIER V.P. ..... 143
TEOULE R. et CADET J. ..... 1
THALER H. et KLEINAU H.J. ..... 69, 70
TSEN C.C. et COLLIER H.B. ..... 208
UGAZIO G. et GABRIEL L. ..... 41
UTSUMI K., OHARA S., YAMAMOTO G., INABA K., URAKAMI H. et YAMAMOTO M. ..... 257
VICTORIA E.J. et BARBER A.A. ..... 136
VISWANATHAN C.V., HOEVET S.P. et LUNDBERG W.O. ..... 235
VON GREUB H.R. et BERNHARD K. ..... 177
WARAVDEKAR V.S., ANDERSON H.J. SASLAW L.D. et SMETANA H.F. . 186
WHEELER D.H. ..... 128
WILBUR K.M., BERNHEIM F. et SHAPIRO O.W. ..... 101
WILLS E.D. ..... 37,113,130,132,149,188, 193
WILLS E.D. et ROTBLAT J. ..... 34
WILLS E.D. et WILKINSON A.E. ..... 35, 36, 189, 207
WINKLER L. ..... 21
WINTERBOURN C.C. et BATT R.D. ..... 245
WITTING L.A. et SCHWEIGERT B.S. ..... 84
WOJTCZAK L., ZALUSKA H. et DRAHOTA Z. ..... 260
WOLFSON N., WILBUR K.M. et BERNHEIM F. ..... 138
WURZIGER J. et SALZER U. ..... 87
YAMAMOTO M., UTSUMI K., OHARA S., INABA K., YAMAMOTO G. et URAKAMI H. ..... 256
YAMAZAKI S. ..... 115
ZALKIN H. et TAPPEL A.L. ..... 45
ZEMAN A. et SCHARMANN H. ..... 81
ZINZADZE C. ..... 233

# INDEX DES TABLEAUX

Pages

TABLEAU I - Composition du mélange d'incubation.. ..... 46

TABLEAU II - Teneurs en phosphore lipidique et en liaisons esters des lipoprotéines normales et des lipoprotéines irradiées..... 49

TABLEAU III - Pourcentages des principaux phospholipides extraits de lipoprotéines avant et après irradiation... ..... 50

TABLEAU IV - Influence des radiations ionisantes sur le rapport $\frac{AGE}{P}$ des lécithines et de leurs dérivés dans les α-L.P.A. plasmatiques.... 51

TABLEAU V - Influence des radiations ionisantes sur le rapport $\frac{AGE}{P}$ des lécithines et de leurs dérivés dans les β-L.P. plasmatiques.. ... 51

TABLEAU VI - Composition en acides gras libres des lipoprotéines avant et après irradiation..... ..... 52

TABLEAU VII - Composition en acides gras des triglycérides des lipoprotéines avant et après irradiation..... ..... 53

TABLEAU VIII - Composition en acides gras des stérides des lipoprotéines avant et après irradiation..... 54

TABLEAU IX - Composition en acides gras des céphalines des lipoprotéines avant et après irradiation..... . .... ..... 55

TABLEAU X - Composition en acides gras des lécithines des lipoprotéines avant et après irradiation.. ..... 56

TABLEAU XI - Composition en acides gras des phospholipides de Rf 0,20 des lipoprotéines avant et après irradiation..... 57

TABLEAU XII - Composition des chaînes acylées des phosphatidylcholines et lysophosphatidylcholines des α-lipoprotéines-albumines irradiées..... ..... . ..... ..... 64

Pages

TABLEAU XIII - Composition des chaînes acylées des phospholipides en fonction de la dose d'irradiation... ..... 66

TABLEAU XIV - Effets des rayonx X sur les groupements -SH sanguins 69

TABLEAU XV - Valeurs $G_{AM}$ en fonction de la dose de rayonnement.... 75

TABLEAU XVI - Valeurs $G_{AM}$ en fonction de la nature et de la dose de rayonnement..... ..... ..... 82

TABLEAU XVII - Protocole expérimental de la mise en évidence de la formation du complexe malonaldéhyde-sérumalbumine humaine... 93

TABLEAU XVIII - Protocole expérimental de la mise en évidence de la formation du complexe malonaldéhyde-cystéine..... 93

TABLEAU XIX - Répartition tissulaire de la radioactivité chez le rat après intubation stomacale de (1-$^{14}$C) acide azélaïque..... 98

TABLEAU XX - Radioactivité des fractions lipidiques globulaires... 99

TABLEAU XXI - Incorporation de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque dans les lipides plasmatiques et globulaires.. ..... 104

TABLEAU XXII - Répartition de la radioactivité plasmatique sur électrophorèse de gel de polyacrylamide après incubation de sang total avec l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque..... ..... 106

TABLEAU XXIII - Influence de l'ATP et du CoA sur l'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans les lipides plasmatiques et globulaires..... 106

TABLEAU XXIV - Incorporation de l'acide (1-$^{14}$C) oléique dans les lipides plasmatiques et globulaires.. ..... 108

TABLEAU XXV - Distribution des radioactivités plasmatiques et globulaires dans le cas d'incorporation d'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque et d'acide (1-$^{14}$C) oléique..... 108

Pages

TABLEAU XXVI - Incorporation des acides (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque et (1-$^{14}$C) oléique dans les lipides plasmatiques..... 111

TABLEAU XXVII - Incorporation des acides (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque et (1-$^{14}$C) oléique dans les lipides globulaires..... 111

TABLEAU XXVIII - Action de la phospholipase A..... ..... 117

TABLEAU XXIX - Taux d'oxydation d'un homogénat hépatique en présence des acides monocarboxylique et dicarboxylique.... 122

# INDEX DES FIGURES

Pages

FIGURE 1 - Produits de l'auto-oxydation de l'acide oléique..... 11

FIGURE 2 - Variations dans le temps de l'isomérisation de l'acide linoléique (E 233), de la formation des hydroperoxydes (E 565) et de la dégradation de l'acide gras (E 543) : réaction avec l'acide thiobarbiturique.. 18

FIGURE 3 - Séparation par chromatographie bidimensionnelle de phospholipides des α-lipoprotéines plasmatiques irradiées..... 61

FIGURE 4 - Séparation chromatographique de diméthylacétals (DMA) et d'esters méthyliques (EM)..... 63

FIGURE 5 - Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques après exposition de sang aux rayons X..... 67

FIGURE 6 - Variation des peroxydes lipidiques après exposition de plasma aux rayons X..... 68

FIGURE 7 - Variation du taux de groupements thiols après exposition de plasma aux rayons X..... 70

FIGURE 8 - Variation du taux de groupements thiols après exposition de sang aux rayons X..... 71

FIGURE 9 - Variation des peroxydes lipidiques après exposition de plasma lyophilisé aux rayons X..... 73

FIGURE 10 - Variation des peroxydes lipidiques après exposition aux rayons X de lipoprotéines plasmatiques lyophilisées 74

FIGURE 11 - Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques après incubation de sang en présence d'une dose croissante de $^{198}Au$..... 79

Pages

FIGURE 12 -,Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques après incubation de sang en présence d'une dose croissante de $^{32}P$..... 80

FIGURE 13 - Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques après incubation de sang en présence d'une dose croissante de $^{131}I$..... 81

FIGURE 14 - Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques dans le sang (Courbe A) et dans le plasma (Courbe B) en fonction du temps sous l'influence de 200 $\mu$C de $^{32}P$..... 83

FIGURE 15 - Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques dans le sang (Courbe A) et dans le plasma (Courbe B) en fonction du temps sous l'influence de 200 $\mu$C de $^{131}I$..... 84

FIGURE 16 - Variation des peroxydes lipidiques plasmatiques dans le sang en fonction du temps sous l'influence de 50 $\mu$C de $^{198}Au$..... 85

FIGURE 17 - Spectres UV des émulsions d'acide linoléique..... 87

FIGURE 18 - Action de l'hydroquinone (Courbe A) et de l'éthylène diamine tétraacétate de sodium (Courbe B) sur la formation des peroxydes lipidiques plasmatiques après incubation de sang en présence de 200 $\mu$C de $^{32}P$..... 89

FIGURE 19 - Action de la sérumalbumine humaine sur la formation de peroxydes lipidiques plasmatiques après incubation de sang en présence de 200 $\mu$C de $^{32}P$..... 90

FIGURE 20 - Action du sulfate ferreux sur la formation de peroxydes lipidiques plasmatiques après incubation de sang en présence de 200 $\mu$C de $^{32}P$..... 91

FIGURE 21 - Autoradiogramme des composés urinaires du rat après intubation d'acide (1-$^{14}C$) azélaïque..... 100

FIGURE 22 - Répartition tissulaire de la radioactivité après intubation d'acide (1-$^{14}C$) azélaïque..... 101

Pages

FIGURE 23 - Incorporation de l'acide (1-$^{14}$C) azélaïque en fonction du temps après l'ingestion de l'acide..... .... 103

FIGURE 24 - Autoradiogramme des chromatographies en couche mince des lipides globulaires (I) et des lipides plasmatiques (II) après incubation avec l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque..... . ..... .... 105

FIGURE 25 - Autoradiogramme de l'électrophorèse du plasma après incubation avec l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque..... 107

FIGURE 26 - Autoradiogramme des chromatographies en couche mince des lipides globulaires (I) et des lipides plasmatiques (II) après incubation avec l'acide (1-$^{14}$C) oléique.... 109

FIGURE 27 - Autoradiogramme des chromatographies en couche mince des lipides plasmatiques après incubation avec l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque (I) et avec l'acide (1-$^{14}$C) oléique (II)..... ..... ..... 110

FIGURE 28 - Autoradiogramme des chromatographies en couches minces des lipides globulaires après incubation avec l'acide (1-$^{14}$C) oléique (I) et avec l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque (II)..... 112

FIGURE 29 - Incorporation de l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque en fonction du temps d'incubation..... 113

FIGURE 30 - Autoradiogramme des chromatographies en couche mince des lipides plasmatiques (A) et des lipides sanguins totaux (B) après incubation avec l'acide (1-$^{14}$C) nonanal-9-oïque..... 115

FIGURE 31 - Influence de la chaleur sur l'incorporation de l'acide nonanal-9-oïque dans le sang et dans le plasma..... 116

FIGURE 32 - Action de la phospholipase A sur le phospholipide (PC) à acide nonanal-9-oïque..... 118

FIGURE 33 - Influence de l'acide azélaïque et de l'acide pélargonique sur la consommation d'oxygène d'homogénats hépatiques. 123

Pages

FIGURE 34 - Variations relatives de la consommation d'oxygène en fonction du temps d'incubation..... 124

# TABLE DES MATIERES


Pages

INTRODUCTION..... 1

1ère PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... 3

2ème PARTIE

TECHNIQUES ..... 33

3ème PARTIE

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I

Action des rayons X sur le sang ..... 47

CHAPITRE II

Action des rayons β sur le sang ..... 77

CHAPITRE III

Etude métabolique des produits de la peroxydation lipidique ..... 97

CONCLUSIONS GENERALES ..... 127

BIBLIOGRAPHIE ..... 129

INDEX ALPHABETIQUE DES AUTEURS ..... 145

INDEX DES TABLEAUX ..... 151

INDEX DES FIGURES ..... 155

Autorisation de soutenance accordée.

TOULOUSE, le 22 AVR. 1971

P/Le Président :
Le Vice-Président,

F. MATHIS